

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

RAFAELA FIGUEIREDO RODRIGUES

**NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PREGABALINA PARA O
TRATAMENTO DE DOR NEUROPÁTICA EM RATOS: OBTENÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E
DA FARMACOCINÉTICA**

Alfenas/MG

2021

RAFAELA FIGUEIREDO RODRIGUES

NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PREGABALINA PARA O
TRATAMENTO DE DOR NEUROPÁTICA EM RATOS: OBTENÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E
DA FARMACOCINÉTICA

Tese apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de
Doutor em Ciências Farmacêuticas
pela Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Ciências
Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a Dr^a Vanessa
Bergamin Boralli Marques

Co-orientadores: Prof^a Dr^a Flávia Chiva
Carvalho e Prof. Dr. Giovane Galdino
de Souza

Alfenas/MG

2021

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Sede

Rodrigues, Rafaela Figueiredo
R484n Nanopartículas poliméricas com pregabalina para o tratamento de dor neuropática em ratos: obtenção, caracterização e avaliação in vivo do efeito antinociceptivo e da farmacocinética / Rafaela Figueiredo Rodrigues – Alfenas, MG, 2021.
176 f.: il. –

Orientadora: Vanessa Bergamin Boralli Marques.
Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, 2021.
Bibliografia.

1. Tratamento da dor neuropática. 2. Neuropatia. 3. Estudo pré-clínico. 4. Nanopartícula polimérica. 5. Quitosana. 6. Farmacocinética - Pregabalina.
I. Marques, Vanessa Bergamin Boralli. II. Título.

CDD- 615

RAFAELA FIGUEIREDO RODRIGUES

"NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PREGABALINA PARA O TRATAMENTO DE DOR NEUROPÁTICA EM RATOS: OBTENÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO E DA FARMACOCINÉTICA"

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 24 de março de 2021

Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Juliana Cancino Bernardi
Instituição: Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Thiago Roberto Lima Romero
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Profa. Dra. Gislaine Ribeiro Pereira
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Profa. Dra. Josie Resende Torres da Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por Juliana Cancino Bernardi, Usuário Externo, em 24/03/2021, às 14:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Vanessa Bergamin Boralli Marques, Professor do Magistério Superior, em 24/03/2021, às 14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Josie Resende Torres da Silva, Professor do Magistério Superior, em 24/03/2021, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Gislaine Ribeiro Pereira, Professor do Magistério Superior, em 24/03/2021, às 14:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Thiago Roberto Lima Romero, Usuário Externo, em 25/03/2021, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0484646 e o código CRC 44E7D83A.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de crescimento, pela sabedoria e tranquilidade nos momentos difíceis, por ter guiado meus passos, direcionado as minhas ações e não permitido que eu desistisse, mesmo com tantas dificuldades encontradas pelo caminho.

Agradeço aos amparadores espirituais pela reposição das minhas energias, por mostrarem que independente da situação, eu não estou sozinha.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Vanessa Bergamin Boralli Marques pela amizade, pelo apoio, pela confiança, pelos conhecimentos compartilhados e pelos momentos agradáveis. Agradeço por sempre me incentivar a buscar conhecimento e soluções.

Agradeço ao meu co-orientador Prof. Dr. Giovane Galdino de Souza pelo apoio, pela confiança, pela colaboração e pelos conhecimentos compartilhados. Agradeço também pela recepção no Laboratório de Fisioterapia Experimental e pela disponibilização do espaço para o desenvolvimento dos experimentos.

Agradeço à minha co-orientadora Prof^a. Dr^a. Flávia Chiva Carvalho pela colaboração e pelos conhecimentos compartilhados.

Agradeço aos animais que deram as suas vidas para a ampliação do conhecimento científico, para auxiliar as pessoas que sofrem com dor neuropática.

Agradeço à Prof^a. Dr^a. Gislaine Ribeiro Pereira pelo conhecimento compartilhado, pela colaboração, por disponibilizar o espaço do Laboratório de Sistemas de Liberação de Fármacos para realização de grande parte deste trabalho, pela convivência agradável.

Agradeço aos professores doutores Diogo Teixeira Carvalho, Juliana Cancino Bernardi, Carla Speroni Ceron, Eduardo Costa de Figueiredo, Mariane Gonçalves Santos, Rudy Bonfílio, Mirta Mir Caraballo por contribuírem com a minha jornada, pela disponibilidade e atenção. Agradeço por contribuírem com conhecimentos compartilhados e pelo apoio técnico para realização de experimentos.

Agradeço aos professores doutores Marcello Garcia Trevisan, Antônio Carlos Doriguetto, Jorge Kleber Chavasco (*in memoriam*), Luiz Cosme Cotta Malaquias, Luiz Felipe Leomil Coelho, Danielle Ferreira Dias, Marisi Gomes Soares, Alexandre Giusti Paiva e Alessandra Esteves pela atenção e pela disponibilização dos espaços físicos e/ou de equipamentos para a realização dos experimentos.

Agradeço à Dr^a. Érika Kristina Incerpi Garcia, médica veterinária do Biotério Central por todo o apoio técnico e conhecimento compartilhado.

Agradeço ao Instituto de Química da Unesp-Araraquara pelas medidas de microscopia eletrônica de alta resolução realizadas.

Agradeço a MsC. Geisi Rojas Barreto, do corpo técnico da empresa Pensabio, pela disponibilidade, pela atenção e pela realização das medidas de análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).

Agradeço ao Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos (LATF), minha segunda casa, pelo suporte.

Agradeço à família LATF: Dr. Alberto Thalisson da Silveira; Dr^a. Ayla Campos do Lago; mestranda Cristiane Feliciano; MsC. e doutorando Diailison Teixeira de Carvalho; Dr. Henrique Dipe de Faria; Dr^a. Juliana Savioli Simões; Dr^a Lailah Cristina de Carvalho Abrão; doutorando Leandro Castilho; MsC. Lellis Henrique Costa; doutoranda Lucimara Mendonça Costa; MsC. e doutoranda Mariana Azevedo Rosa; MsC. e doutorando Matheus Siqueira Silva; MsC. e doutorando Milton Kennedy Aquino Júnior; mestrando Rafael Leite Coelho; MsC. e doutorando Rodrigo Vicentino Plácido; Dr^a. Taila Kawano; MsC. e doutoranda Tássia Venga Mendes, por todo o apoio, conversas, convivência agradável, troca de conhecimentos e suporte técnico nos equipamentos durante todos esses anos. Aprendi muito com vocês.

Agradeço à Dr^a. Valéria de Moura Leite Naves e à Dr^a Sandra Barbosa Neder Agostini do Laboratório de Sistemas de Liberação de Fármacos pelo apoio, pelos conhecimentos compartilhados e pela convivência agradável. Aprendi muito com vocês.

Agradeço aos colegas do Laboratório de Fisioterapia Experimental Dr^a Rafaela Silva dos Santos, MsC. e doutoranda Thamyris Reis Moraes, MsC. e doutorando Iago Henrique Silva Malta e MsC. e doutoranda Livia Silvestre Elisei pela convivência agradável e pelos conhecimentos compartilhados.

Agradeço aos colegas MsC. e doutoranda Jádina Santos Vieira, Dr^a Merelym Ketterym de Oliveira e MsC. e doutorando Fernando Vitor Vieira do Laboratório de Fisiologia pelos conhecimentos compartilhados e pela convivência agradável.

Agradeço à Dr^a. Jennifer Tavares Jacson Freitas, MsC. Thúlio Wliandon Lemos Barbosa, mestrando Homero de Oliveira Júnior, mestranda Nicole Okura pelo auxílio técnico na realização das caracterizações físico-químicas

Agradeço à doutoranda Juliana Barbosa Nunes pelo auxílio técnico, conhecimentos compartilhados e pela convivência agradável. Agradeço por ser as minhas mãos, quando as minhas já não conseguiam executar com destreza os procedimentos.

Agradeço às alunas de iniciação científica Daniele Scalco Vasconcelos, Tainara Alves Vendreschi, Paloma Freitas dos Santos, Mariana Hummel pelo auxílio na realização deste trabalho.

Agradeço às Técnicas-Administrativas em Educação Dr^a Patrícia Penido Maia, Andréa Marques Roberto Passos e Neila Sena Ribeiro, pela convivência agradável e pelo apoio técnico.

Agradeço às colaboradoras Márcia Dantas e Valdirene por nos auxiliarem na organização e limpeza do LATF. Vocês fizeram do laboratório um lugar impecável e aconchegante.

Agradeço à Faculdade De Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade oferecida.

Agradeço aos meus queridos Cecília e Marcos, Ivan e Luzia pelas orações e fortalecimento da minha fé.

Agradeço aos meus pais Mário Cândido Rodrigues Filho e Elisabete Rezende Figueiredo Rodrigues e ao meu irmão Fabio Figueiredo Rodrigues pelo grande incentivo, por estarem na retaguarda, pelo amor incondicional, pelo apoio sem

limites, pelo carinho, por reabastecerem as minhas energias nos momentos de cansaço, pela compreensão pela minha ausência. Agradeço por terem abraçado o meu sonho de ser cientista.

Agradeço à minha família Alfenense Pedro Donizetti de Lima e Rosângela de Lima por todo o apoio, carinho e convivência. Vocês tornaram a minha jornada em Alfenas mais leve e alegre.

Agradeço ao meu namorado Rafael Geraldo de Lima pelo amor, pelo carinho, pelo suporte emocional, pela compreensão, pela paciência, pela convivência, por cuidar tanto de mim, pela dedicação, pela companhia nos finais de semana e até tarde da noite no laboratório. Agradeço por estar comigo na realização do meu sonho. Palavras não são suficientes para expressar a minha gratidão.

Agradeço à FAPEMIG pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001.

“Todo mundo é capaz de superar
uma dor, exceto quem a sente”

William Shakespeare (1564-1616)

“O sofrimento nos leva ao
alento, e nos mostra a
capacidade que temos de
surpreender a nós mesmos”

Lamharck Dias (2018)



RESUMO

A dor neuropática é um tipo de dor crônica, em que ocorre lesão no sistema nervoso somatossensorial e é difícil de ser tratada. Um sistema de liberação controlada pode alterar os parâmetros farmacocinéticos da substância, reduzindo os efeitos colaterais, aumentando adesão ao tratamento. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi obter e caracterizar nanopartículas poliméricas com pregabalina (PG), além de verificar sua farmacocinética, seu potencial de nocicepção e o efeito colateral (sonolência) desta formulação. Para isso, as nanopartículas poliméricas com PG foram desenvolvidas utilizando-se o método de geleificação ionotrópica, entre quitosana e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose. As partículas apresentaram um tamanho médio de 432 nm, com boa homogeneidade no tamanho das partículas forma esférica, o potencial zeta médio de +19,0 mV e o pH médio de 5,7. A formulação apresentou taxa de associação de aproximadamente 44%. Os testes de difração de raios-X, termogravimetria e calorimetria exploratória diferencial sugeriram a formação das nanopartículas poliméricas com PG. O teste de espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier confirmou a forma de interação das nanopartículas. Para a avaliação da farmacocinética, do efeito antinociceptivo, coordenação motora, comportamento locomotor e efeito colateral foram utilizados ratos *Wistar* machos (220-250 g), divididos em 4 grupos: nanopartícula polimérica com PG (NP PG), PG, nanopartícula vazia (NP VAZ) e água ultrapura (ÁGUA), e receberam as substâncias por via oral, em dose única (10 mg/Kg). Para o cálculo dos parâmetros farmacocinéticos, as concentrações plasmáticas foram determinadas por UPLC-MS/MS. A NP PG apresentou aumento no volume de distribuição e no *clearance* comparada à PG. Para a avaliação do efeito antinociceptivo, os animais passaram pela indução da dor neuropática através da constrição crônica do nervo ciático (CCI) na pata direita e receberam as substâncias no 14º dia após a CCI e a alodinia mecânica foi testada apenas na pata direita antes da CCI e no 14º dia: antes da administração das substâncias, 1, 2:15, 4, 8, 24, 48 e 72 h após a administração das substâncias. Quando comparamos os grupos CCI-PG e CCI-NP PG com CCI-ÁGUA o grupo CCI-PG apresentou efeito antinociceptivo em 1 a 8 h e o grupo CCI-NP PG em 1 a 48 h, após a administração das substâncias. Quando comparamos CCI-NP PG com CCI-PG, o perfil

antinociceptivo dos grupos só diferiu no tempo de 48 horas após a administração das substâncias, mostrando que a NP PG ainda mantia o efeito positivo em redução da nocicepção. Os resultados do rota-rod mostraram que nenhuma das substâncias ocasionou déficit motor em nenhum dos tempos testados. Os resultados do campo aberto mostraram o mesmo perfil de redução de exploração ao longo do tempo, com todas as substâncias administradas. Os resultados da sonolência demonstraram que tanto o grupo PG quanto o NP PG apresentaram efeitos sedativos, quando comparados com os grupos ÁGUA e NP VAZ; com duração do efeito sedativo da NP PG significativamente menor que da PG. Assim, a administração de PG através de nanopartículas poliméricas apresentou prolongamento do efeito antinociceptivo, maior tempo de permanência no organismo e redução de efeitos colaterais.

Palavras-chave: Tratamento da dor neuropática. Neuropatia. Estudo pré-clínico. Nanopartícula polimérica. Quitosana. Farmacocinética da pregabalina.

ABSTRACT

Neuropathic pain is a type of chronic pain, in which damage occurs to the somatosensory nervous system and is difficult to treat. A controlled release system can change the pharmacokinetic parameters of the substance, reducing side effects and increasing adherence to treatment. Thus, the aim of this work was to obtain and characterize polymeric nanoparticles with pregabalin (PG), and to verify its pharmacokinetics, nociception potential and side effect (drowsiness) of this formulation. For this, polymeric nanoparticles with PG were developed using the ionotropic gelling method, between chitosan and hydroxypropylmethylcellulose phthalate. The particles showed an average particle size of 432 nm, with good homogeneity in particle size spherical shape, the average zeta potential of +19.0 mV and the average pH of 5.7. The formulation showed an association rate of approximately 44%. X-ray diffraction, thermogravimetry and differential exploratory calorimetry tests suggested the formation of the polymeric nanoparticles with PG. The Fourier transform infrared spectroscopy test confirmed the interaction form of the nanoparticles. For the evaluation of pharmacokinetics, antinociceptive effect, motor coordination, locomotor behavior and side effect, male Wistar rats (220-250 g) were used and divided into 4 groups: polymeric nanoparticle with PG (NP PG), PG, empty nanoparticle (NP VAZ) and ultrapure water (WATER), and received the substances orally, in a single dose (10 mg/Kg). To calculate the pharmacokinetic parameters, plasma concentrations were determined by UPLC-MS/MS. PG NP showed increased volume of distribution and clearance compared to PG. To evaluate the antinociceptive effect, the animals underwent induction of neuropathic pain by chronic sciatic nerve constriction (CCI) in the right paw and received the substances on day 14 after CCI and mechanical allodynia was tested only in the right paw before CCI and on day 14: before administration of the substances, 1, 2:15, 4, 8, 24, 48 and 72 h after administration of the substances. When we compared the CCI-PG and CCI-NP PG groups with CCI-WATER, the CCI-PG group showed an antinociceptive effect at 1 to 8 h and the CCI-NP PG group at 1 to 48 h after the administration of the substances. When we compared CCI-NP PG with CCI-PG, the antinociceptive profile of the groups only differed at 48 h after the administration of the substances, showing that NP PG still maintained the positive effect in reducing nociception. The results of the rota-rod showed that none of the substances caused

motor deficit in any of the tested times. The results of the open field showed the same profile of reduced exploration over time with all substances administered. The drowsiness results showed that both the PG and NP PG groups showed sedative effects, when compared to the WATER and NP VAZ groups; with the duration of the sedative effect of NP PG significantly shorter than that of PG. Thus, the administration of PG through polymeric nanoparticles showed prolongation of the antinociceptive effect, longer duration of stay in the body and reduction of side effects.

Keywords: Treatment of neuropathic pain. Neuropathy. Preclinical study. Polymeric nanoparticle. Chitosan. Pharmacokinetics of pregabalin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula estrutural da pregabalina	28
Figura 2 -	Comparação das variações das concentrações de fármacos administrados por sistemas convencionais e por sistemas de liberação controlada	35
Figura 3 -	Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas	39
Figura 4 -	Representação esquemática de nanocompósito	39
Figura 5 -	Fórmula estrutural da quitosana	40
Figura 6 -	Representação esquemática do preparo da NP	44
Figura 7 -	Representação esquemática da célula de Franz	50
Figura 8 -	Fórmula estrutural do HPMCP	52
Figura 9 -	Aspecto das nanopartículas no teste A e no teste B	53
Figura 10 -	MEV-FEG das NP PG (A) e NP VAZ (B).....	59
Figura 11 -	FTIR por dropping em KBr das nanopartículas e componentes da formulação	60
Figura 12 -	Representação da complexação polieletrólítica entre QS e HPMCP	63
Figura 13 -	Representação da complexação da QS com HPMCP e participação da PG	65
Figura 14 -	Curvas de DSC das nanopartículas e componentes da formulação, obtidas sob fluxo de calor de 10°C/min, no intervalo de aquecimento de 25-400°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio	66
Figura 15 -	Curvas TG e DTA de Sol. QS (A), Sol. HPMCP (B), Sol. Tampão (C), Sol. PG (D), NP VAZ (E) e NP PG (F) obtidas em razão do aquecimento de 10°C/min, no intervalo entre 25 a 550°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio	71
Figura 16 -	Difratogramas de raios X das NPs e dos constituintes liofilizados	74

Figura 17 - Percentual de massa acumulada de PG liberada da nanopartícula ao longo do tempo	78
Figura 18 - Representação esquemática da canulação da veia jugular direita	84
Figura 19 - Perfil farmacocinético médio após administração oral de PG e nanopartícula de PG (10 mg/Kg) em ratos (n=6, para cada perfil) administrada em dose única em ratos	88
Figura 20 - Mecanismo representativo da condução da nocicepção da periferia até o SNC	95
Figura 21 - Manejo farmacológico preconizado para a dor neuropática	98
Figura 22 - Principais modelos animais de dor neuropática	101
Figura 23 - Diagrama esquemático ilustrando a posição das ligaduras no modelo CCI no nervo ciático	102
Figura 24 - Modelos para avaliação da resposta antinociceptiva	104
Figura 25 - Procedimento cirúrgico de CCI	111
Figura 26 - Animais no aparato de teste	112
Figura 27 - Filamentos de von Frey para animais	112
Figura 28 - Diagrama da área plantar da pata utilizada para a avaliação da alodinia mecânica	113
Figura 29 - Delineamento experimental do protocolo de medidas do limiar nociceptivo	114
Figura 30 - Teste de Rota-rod em execução	115
Figura 31 - Delineamento experimental do teste de rota-rod	116
Figura 32 - Teste de campo aberto em execução	117
Figura 33 - Delineamento experimental das avaliações comportamentais no campo aberto	118
Figura 34 - Curva analítica da PG em solvente (HPLC-UV)	164
Figura 35 - <i>Carry over</i> PG HPLC-UV	166
Figura 36 - Curva analítica da PG em plasma de rato (UPLC-MS/MS).	170
Figura 37 - <i>Carry over</i> PG UPLC-MS/MS	172

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Distribuição do tamanho das NP por intensidade analisado por DLS	55
Gráfico 2 -	Distribuição do tamanho das partículas pela técnica de NTA	56
Gráfico 3 -	Efeito antinociceptivo da PG em solução durante 72 h após a sua administração	121
Gráfico 4 -	Efeito antinociceptivo da nanopartícula de PG durante 72 h após a sua administração	123
Gráfico 5 -	Comparação entre as substâncias – animais operados e água <i>sham</i> – durante 72 h após a administração.....	125
Gráfico 6 -	Avaliação do comportamento motor	127
Gráfico 7 -	Avaliação da distância percorrida no campo aberto	129
Gráfico 8 -	Avaliação do tempo de imobilidade no campo aberto	130
Gráfico 9 -	Avaliação do movimento vertical (<i>rearing</i>) dos animais no campo aberto	131
Gráfico 10 -	Avaliação do tempo de sono induzido por barbitúrico	135

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tamanho das nanopartículas (DLS e NTA), PDI, pH e potencial zeta dos lotes de NP PG e NP VAZ	54
Tabela 2 -	Eventos observados nos espectros de FTIR	61
Tabela 3 -	Avaliação do tamanho, polidispersão e do potencial zeta das amostras de NP PG e NP VAZ recém preparadas	76
Tabela 4 -	Avaliação do tamanho, polidispersão e do potencial zeta das amostras de NP PG e NP VAZ após 30 dias do preparo, em meio aquoso, armazenadas em temperatura de 25°C, sem contato com a luz e com a atmosfera	76
Tabela 5 -	Parâmetros farmacocinéticos estimados após administração oral de PG e nanopartícula de PG (10 mg/Kg) em ratos (n=6, para cada perfil). Dados expressos como mediana, IC=95%	87
Tabela 6 -	Limite inferior de quantificação para a PG (HPLC-UV)	165
Tabela 7 -	Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de PG por HPLC-UV	168
Tabela 8 -	Limite inferior de quantificação para a PG (UPLC-MS/MS)	171
Tabela 9 -	Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de PG em plasma de rato por UPLC-MS/MS	174

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

% v/v	porcentagem volume/volume
% m/m/m	porcentagem massa/massa/massa
°C	grau Celsius
µg	micrograma
µg/mL	micrograma por mililitro
µL	microlitro
Å	ångström
ADT	antidepressivos tricíclicos
AIDS	síndrome da imunodeficiência adquirida (do inglês <i>acquired immunodeficiency syndrome</i>)
ANOVA	análise de variância
ATP	trifosfato de adenosina
AUC	área sob a curva (do inglês <i>area under the curve</i>)
BTX-A	toxina botulínica A
C _{adicionada}	concentração adicionada
CCI	constricção crônica do nervo ciático (do inglês <i>chronic constriction injury</i>)
CCI-ÁGUA	constricção crônica do nervo ciático e recebeu água
CCI-NP PG	constricção crônica do nervo ciático e recebeu nanopartícula de PG
CCI-NP VAZ	constricção crônica do nervo ciático e recebeu nanopartícula vazia
CCI-PG	constricção crônica do nervo ciático e recebeu PG
CID	classificação internacional de doenças
Cl	<i>clearance</i>
cm	centímetro
C _{max}	concentração máxima

C _{obs}	concentração observada
COX-2	enzima ciclo-oxigenase 2
CQA	controle de qualidade alto
CQB	controle de qualidade baixo
CQM	controle de qualidade médio
CR	liberação controlada (do inglês <i>controlled release</i>)
CSD	The Cambridge Structural Database
CV	coeficiente de variação
CYP-450	enzimas do sistema citocromo p-450
DLS	dispersão dinâmica da luz (do inglês <i>dynamic light scattering</i>)
DP	desvio padrão
DPa	desvio padrão do intercepto com o eixo y
DPR	desvio padrão relativo
DRX	difração de raios X
DSC	calorimetria exploratória diferencial (do inglês <i>differential scanning calorimeter</i>)
DTA	análise térmica diferencial (do inglês <i>differential thermal analysis</i>)
E.P.M	Erro padrão da média
EPR	erro padrão relativo
FDA	U. S. <i>Food and Drug Administration</i>
FF	forma farmacêutica
FMN	fator de matriz normalizado
FTIR	espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier transformed infrared spectroscopy</i>)
g	unidade de força
g	grama
GABA	ácido gama-aminobutírico
h	hora

HIV	vírus da imunodeficiência humana (do inglês <i>human immunodeficiency vírus</i>)
HPLC-UV	cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (do inglês <i>high performance liquid chromatography – ultravioleta detector</i>)
HPMCP	ftalato de hidroxipropil-metilcelulose (do inglês <i>hydroxypropyl methylcellulose phthalate</i>)
I.P.	administração por via intraperitoneal
IASP -	Associação Internacional para Estudos da Dor (do inglês <i>International Association for the Study of Pain</i>)
IR	liberação imediata (do inglês <i>immediate release</i>)
ISRSN	inibidores seletivos da recaptação de serotonina e noradrenalina
J/g	joule por grama
K _{ATP}	canal para potássio dependente de trifosfato de adenosina
KBr	brometo de potássio
kg	kilograma
kV	kilovolts
L/kg	litro por kilograma
L5/L6	região lombar, 5 ^a e 6 ^a vértebras
L7	região lombar, 7 ^a vértebra
LD	limite de detecção
LIQ	limite inferior de quantificação
M	molar
mA	mili ampere
MB	medida basal
MEV-FEG	microscopia eletrônica de varredura de alta resolução de emissão por campo
mg	miligrama
mg/kg	miligrama por quilograma
mg/mL	miligrama por mililitro

min	minuto
mL	mililitro
mL/min	mililitro por minuto
mm	milímetro
mV	milivolts
NeuPSIG	Grupo de Interesse Especial em Dor Neuropática (do inglês <i>neuropathic pain special interest group</i>)
NF- κ β	fator nuclear <i>kappa beta</i> (do inglês <i>nuclear facto kappa beta</i>)
ng/mL	nanograma por mililitro
nm	nanômetro
NMDA	n-metil -D- aspartato
NP	nanopartícula
NP PG	nanopartícula de PG
NP VAZ	nanopartícula vazia, sem PG
NPs	nanopartículas
NTA	análise de rastreamento de nanopartícula (do inglês <i>nanoparticle tracking analysis</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDI	índice de polidispersividade
PG	pregabalina
PGA	poliglicolídeos
pH	potencial hidrogeniônico
PK	farmacocinética (do inglês <i>pharmacokinetic</i>)
pKa	potencial hidrogeniônico do ácido (ka é constante de acidez)
PLA	polilactídeos
PLGA	poli-lactídeos-co-glicolídeos
PRGC	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
QS	quitosana
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada

RMN	ressonância magnética nuclear
RP	recém preparada
rpm	rotações por minuto
SBED	Sociedade Brasileira para os Estudos da Dor
SCB	Sistema de Classificação Biofarmacêutica
SE	detector de elétrons secundários
SH	<i>sham</i> ou falso operado
SH- NP PG	<i>sham</i> e recebeu nanopartícula de pregabalina
SH-ÁGUA	<i>sham</i> e recebeu água
SH-NP VAZ	<i>sham</i> e recebeu nanopartícula vazia
SH-PG	<i>sham</i> e recebeu pregabalina
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
Sol. HPMCP	solução de ftalato de hidroxipropil-metilcelulose
Sol. PG	solução de pregabalina
Sol. QS	solução de quitosana
Sol. tampão	solução tampão fosfato de sódio
$t_{1/2}$	meia vida
T11/T12	região torácica, vértebras 11 e 12
TG	termogravimetria
TGI	trato gastrointestinal
t_{max}	tempo para atingir a concentração máxima
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa (do inglês alfa <i>tumor necrosis factor</i>)
TR	tempo de retenção
TRPA1	receptor de potencial transitório de anquirina 1
UPLC-MS/MS	cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (do inglês <i>ultraperformance liquid chromatography with tandem mass spectrometry</i>)
V.O.	administração por via oral

Vd	volume de distribuição
vs.	<i>versus</i>
W	Watts
λ	comprimento de onda

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVOS GERAIS	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3 REFERENCIAL TEÓRICO - PREGABALINA (PG)	28
3.1 MECANISMO DE AÇÃO DA PG	28
3.2 FARMACOCINÉTICA DA PG	30
3.3 IMPORTÂNCIA DA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PG	31
CAPÍTULO 1 – NANOPARTÍCULA COMO FORMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA ...	34
4 REFERENCIAL TEÓRICO	34
4.1 FORMA FARMACÊUTICA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA.....	34
4.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA BASEADOS EM NANOTECNOLOGIA .	37
5 MÉTODOS	43
5.1 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PREGABALINA	43
5.1.1 Teste de solubilização da PG em diversos pHs para determinação do método de preparo das nanopartículas	43
5.1.2 Método de preparo das nanopartículas poliméricas com PG	44
5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS	45
5.2.1 Determinação do tamanho das partículas, do índice de polidispersão, do potencial zeta e do pH	45
5.2.3 Avaliação da taxa de associação da PG à NP	45
5.2.4 Análise morfológica das nanopartículas	47
5.2.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	47
5.2.6 Análises térmicas	48
5.2.7 Difração de raios X (DRX)	48
5.2.8 Estabilidade	49
5.3 LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	49
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
6.1 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PG	51
6.1.1 Teste de solubilização da PG em diversos pHs para determinação do método de preparo das nanopartículas	51

6.1.2 Preparo das nanopartículas poliméricas com PG	51
6.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS	54
6.2.1 Tamanho da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanopartículas	54
6.2.2 Avaliação da taxa de associação de PG à NP	58
6.2.3 Análise morfológica das nanopartículas	59
6.2.4 Análise FTIR	60
6.2.5 Análises térmicas	65
6.2.6 Difração de raios-X	74
6.2.7 Estabilidade	76
6.3 LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	77
7 CONCLUSÕES PARCIAIS	79
CAPÍTULO 2 – FARMACOCINÉTICA	80
8 REFERENCIAL TEÓRICO	80
8.1 DEFINIÇÃO	80
9 MÉTODOS	82
9.1 ANIMAIS	82
9.2 MEDICAMENTOS E SUBSTÂNCIAS	82
9.3 TESTES FARMACOCINÉTICOS <i>IN VIVO</i> DA NANOPARTÍCULA DE PG	83
9.3.1 Método cromatográfico de análise de PG em plasma de rato	85
9.4 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA	86
10 RESULTADOS E DISCUSSÕES	87
11 CONCLUSÃO PARCIAL	90
CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA NP PG	91
12 REFERENCIAL TEÓRICO	91
12.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA DOR	91
12.2 FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA	93
12.3 TRATAMENTO PARA DOR NEUROPÁTICA	97
12.4 MODELOS EXPERIMENTAIS	99
12.4.1 Constrição crônica do nervo ciático (CCI)	101
12.4.2 Modelo para avaliação da resposta antinociceptiva	103
12.4.3 Modelos para caracterização da atividade farmacológica no SNC	105
13 MÉTODOS	108
13.1 ANIMAIS	108
13.2 MEDICAMENTOS E SUBSTÂNCIAS	108
13.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NP PG	110

13.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR (TESTE DE ROTA-ROD).....	114
13.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO REDONDO	116
13.6 AVALIAÇÃO DO SONO INDUZIDO POR BARBITÚRICOS.....	119
14 RESULTADOS E DISCUSSÕES	120
14.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NP PG	120
14.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR (TESTE DE ROTA-ROD).....	126
14.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO REDONDO	128
14.4 AVALIAÇÃO DO SONO INDUZIDO POR BARBITÚRICOS.....	133
15 CONCLUSÃO PARCIAL	136
16. CONCLUSÃO FINAL	137
REFERÊNCIAS	139
APÊNDICE A – MATERIAIS UTILIZADOS	159
APÊNDICE B – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (HPLC-UV) PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE ASSOCIAÇÃO DA PG À NP E LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	163
APÊNDICE C – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (UPLC-MS/MS) PARA AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA	169
ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	176

1 INTRODUÇÃO

A dor neuropática geralmente é uma condição crônica, onde caracteriza-se duração igual ou superior a 3 meses ou aparecimento de quadros dolorosos recorrentes, ocasionada por lesão ou doença no sistema nervoso somatossensorial, que desencadeiam sintomas como diminuição ou perda de sensibilidade, resposta dolorosa aumentada frente a um estímulo doloroso (hiperalgesia) ou resposta dolorosa frente a um estímulo geralmente não doloroso (alodinia). A ocorrência deste tipo de dor afeta até 10% da população mundial. Recentemente, esta patologia foi inserida na Classificação Internacional de Doenças e Problemas de Saúde (CID) da Organização Mundial de Saúde (OMS), como pertencente à categoria CID-11 (SCHOLZ *et al.*, 2019).

Dor neuropática é frequentemente observada em pacientes com câncer, síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS, do inglês *acquired immunodeficiency syndrome*), diabetes persistente, síndrome do disco lombar, infecção por herpes, lesão traumática da medula espinhal, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral e pós-cirurgia (toracotomia, herniorrafia, mastectomia, esternotomia) (ANDERSON *et al.*, 2019; DiPIERRO; SETTEMBRE, 2013; GIBBS *et al.*, 2019; PAPAGIANNI; METALLIDIS; TZIOMALOS, 2018; PERKINS; KEHLET, 2000; SCOTT *et al.*, 2019; WASAN *et al.*, 2019; WATSON; SANDRONI, 2016).

Devido à complexidade e cronicidade, o tratamento farmacológico preconizado para este tipo de dor ocorre pela utilização de coanalgésicos, como os antidepressivos e os anticonvulsivantes, conforme relatado por Dworkin *et al.* (2007). Com a inserção da dor neuropática crônica no CID-11, facilitou-se a codificação de distúrbios dolorosos dentro da categoria de tratamento mais adequada da classificação (SCHOLZ *et al.*, 2019). No entanto, a dor neuropática é difícil de ser tratada, principalmente devido à ausência de efetividade e limitação dos tratamentos disponíveis, além de efeitos colaterais e tolerância aos medicamentos, que afetam negativamente a qualidade de vida dos pacientes (BOYLE *et al.*, 2012; COHEN; MAO, 2014; ZILLIOX, 2017).

A pregabalina (PG) é um dos medicamentos de primeira escolha para o tratamento da dor neuropática, segundo Cavalli *et al.* (2019). As orientações

sugerem que o tratamento da dor neuropática com PG pode ser iniciado com a dose de 150 mg ao dia, conforme relatado por Moore *et al.* (2009), e que existe correlação dose-resposta significativa, ou seja, a dor neuropática responde melhor com o aumento da dose de PG, de acordo com Serpell *et al.* (2017). No entanto, as evidências sugerem que doses menores (50-75 mg/dia) são preferidas, já que fornecem eficácia aceitável e boa tolerância, principalmente em decorrência da ampla gama de efeitos colaterais. Sonolência, tontura e perda de cognição são os efeitos colaterais mais comuns observados em pacientes em uso de PG (DWORKIN *et al.*, 2007; KAMBLE *et al.*, 2017). Ainda, foi observado que cerca de 15% dos pacientes que estavam usando PG para tratamento dor neuropática, mesmo com doses aceitáveis, abandonam o tratamento em decorrência dos efeitos colaterais (ECHTERHOFF, 2012; MOORE *et al.*, 2009).

No intuito de minimizar os efeitos colaterais, diminuir a toxicidade e reduzir as terapias falhas, surgiram os sistemas de liberação modificada de fármacos, conforme os estudos de Shargel, Wu-Pong e Yu (2012). Especialmente os baseados em nanotecnologia, que apresentam vantagens como maior biodistribuição no Sistema Nervoso Central (SNC), considerável aumento na biodisponibilidade ou alteração na distribuição corporal, possibilitando a redução de dose e diminuição de efeitos adversos (ARACHCHIGE; RESHETNYAK; ANDREEV, 2015; KREUTER, 2014).

Dessa forma, a nossa hipótese foi desenvolver uma formulação de nanopartícula polimérica contendo PG, que prolongasse a duração do efeito antinociceptivo, melhorando a percepção da nocicepção, sem causar efeitos indesejados, em modelo de constrição crônica do nervo ciático.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

O presente trabalho teve como objetivo geral a proposição de nova forma farmacêutica (nanopartícula polimérica) contendo pregabalina para um tratamento mais eficaz, com prolongamento de efeito e redução de efeitos colaterais para nocicepção induzida experimentalmente.

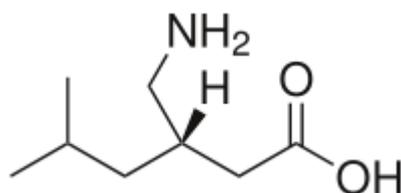
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter e caracterizar a formulação de nanopartículas poliméricas com pregabalina, desenvolvidas neste trabalho;
- b) Determinar os parâmetros farmacocinéticos das nanopartículas poliméricas com pregabalina em ratos;
- c) Avaliar o efeito antinociceptivo das nanopartículas polimérica com pregabalina na dor neuropática crônica induzida por constrição crônica do nervo ciático *in vivo*;
- d) Investigar os principais efeitos colaterais das nanopartículas poliméricas com pregabalina em ratos;
- e) Desenvolver e validar métodos analíticos para quantificação de pregabalina em plasma e em formulação.

3 REFERENCIAL TEÓRICO - PREGABALINA (PG)

Segundo as diretrizes farmacológicas para o tratamento da dor neuropática, a pregabalina é um dos medicamentos de primeira escolha para o tratamento da dor neuropática (FINNERUP *et al.*, 2015). A PG é comercializada como S-enantiômero farmacologicamente ativo do ácido 3-aminometil-5-metilhexanóico (FIGURA 1). Além disso, a PG é um composto análogo estrutural do ácido gama-aminobutírico (GABA), com propriedades anticonvulsivantes, anti-hiperalgésicas e ansiolíticas, de acordo com Aydoğan *et al.* (2014). A PG Possui peso molecular de 159,22 g/mol e é bastante solúvel em água (PUBCHEM, 2005). De acordo com o Sistema de Classificação Biofarmacêutica (SCB), a PG é um composto de classe I, com alta solubilidade e alta permeabilidade (QIN *et al.*, 2018).

Figura 1 - Fórmula estrutural da pregabalina



Fonte: Pubchem (2005).

A PG é comercializada desde 2004 pela Pfizer®, na forma de comprimido de liberação imediata, com dose diária recomendada de 150 a 600 mg, dividida em 2 ou 3 administrações (DWORKIN *et al.*, 2007). Este medicamento foi aprovado pela agência reguladora dos Estados Unidos (U. S. *Food and Drug Administration* – FDA) para o tratamento de fibromialgia, neuropatia diabética periférica, dor ocasionada pela injúria da medula espinhal, dor neuropática pós-herpética e adjuvante no tratamento de crises epiléticas (FDA, 2004; VINIK, CASELLINI, NEVORET, 2018).

3.1 MECANISMO DE AÇÃO DA PG

Embora a PG seja semelhante estruturalmente ao GABA, não foram encontrados relatos da mesma ser metabolizada em GABA e também não apresenta afinidade de ligação direta para os receptores GABA. No entanto, doses

mais elevadas de PG podem aumentar o conteúdo neuronal de GABA, através do aumento da atividade da enzima ácido glutâmico descarboxilase, resultando em diminuição de excitabilidade neuronal (BRAWEK *et al.*, 2009; LANNEAU *et al.*, 2001; TAYLOR; ANGELOTTI; FAUMAN, 2007; WASZKIELEWICZ *et al.*, 2011).

O fármaco se liga com grande afinidade e especificidade às proteínas *alfa-2-delta-1* do canal para cálcio dependente de voltagem no SNC, inibindo sua expressão funcional, com concomitante inibição do influxo de cálcio, não liberando então neurotransmissores excitatórios como glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (PRGC), noradrenalina, serotonina e dopamina na fenda sináptica (DAVIES *et al.*, 2007; FIELD *et al.*, 2001; GAJRAJ, 2007; PERRET; LUO, 2009; VARTANIAN *et al.*, 2006).

Ainda, a PG aumenta a atividade do transportador da recaptura de glutamato neuronal tipo 3, diminuindo as respostas glutamatérgicas. Tem ainda sido relatado que a PG abre os canais para potássio sensíveis ao trifosfato de adenosina (ATP) (K_{ATP}), produzindo efeitos antinociceptivos, pela redução da excitabilidade neuronal, inibindo a liberação de diferentes neurotransmissores, incluindo substância P na medula espinhal (RYU *et al.*, 2012; SOARES *et al.*, 2000).

Além disso, a PG exerce efeitos benéficos sobre o alívio da dor neuropática através da mediação de ações anti-inflamatórias, incluindo a diminuição de citocinas pró-inflamatórias induzidas pela ativação de fator nuclear *kappa beta* ($NF-\kappa\beta$), suprime a produção excessiva de fator de necrose tumoral *alfa* ($TNF-\alpha$) nos gânglios da raiz dorsal da medula, diminui a liberação de neuropeptídeos como substância P e PRGC, inibe a expressão da enzima ciclo-oxigenase 2 (COX-2), além de suprimir outros componentes imunes que tem impacto sobre a neuropatia periférica, como a atividade de células *natural killer* ativadas e a proliferação de linfócitos que acompanham a lesão crônica no nervo (FEHRENBACHER; TAYLOR; VASKO, 2003; JANG *et al.*, 2012; KREMER *et al.*, 2016; PARK *et al.*, 2008).

Quando ocorre uma lesão nervosa, as fibras aferentes nociceptivas do tipo A delta danificadas e não danificadas podem gerar potenciais de ação espontâneos, ocasionando a sensibilização da resposta nociceptiva do SNC, mais especificamente no corno dorsal da medula espinhal. A PG também apresenta ação sobre essa sensibilização do SNC, já que é capaz de reduzir a hiperatividade do impulso nociceptivo no corno dorsal da medula espinhal, pela redução da liberação

de aminoácidos (ex: aspartato e glutamato) neste local (CODERRE *et al.*, 2005; DING *et al.*, 2014; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

Somado a isso, existem evidências de que os gabapentínicos, utilizados de forma aguda, podem recrutar a via descendente noradrenérgica que se origina do *locus coeruleus*, fazendo com que ocorra um aumento dos níveis extracelulares da medula espinhal de noradrenalina, provavelmente decorrente da diminuição da atividade GABAérgica dependente de pKa e do aumento dos níveis glutamatérgicos no *locus coeruleus*, fazendo com que ocorra inibição da nocicepção na medula espinhal. No entanto, não se sabe se esse mecanismo é ativado em tratamentos prolongados (SUTO; EISENACH; HAYASHIDA, 2014; SUTO *et al.*, 2014 YOSHIZUMI *et al.*, 2012).

Ainda, a PG pode aumentar a liberação de óxido nítrico, o que pode aumentar a liberação de opioides endógenos, que são moduladores descendentes de óxido nítrico, para atenuar a dor neuropática em ratos submetidos à CCI, como mostrado no estudo proposto por Verma *et al.* (2019). Sabe-se que os sistemas opioides e canabinoides são interdependentes e que o sistema endocanabinoide desempenha um importante papel na atenuação da dor neuropática (CASTANE *et al.*, 2006; KREMER *et al.*, 2016). No entanto, não foram encontrados relatos que a PG possa atuar no sistema endocanabinoide.

3.2 FARMACOCINÉTICA DA PG

A PG de liberação imediata é rapidamente e extensivamente absorvida após administração oral, atingindo a concentração plasmática máxima (C_{max}) em 1 h após a respectiva dose, em jejum. A PG é absorvida essencialmente nas partes superiores do trato gastrointestinal (TGI), principalmente no duodeno. A biodisponibilidade oral deste fármaco é maior ou igual a 90%, independentemente da dose administrada. A ingestão de alimentos diminui a absorção de PG, com a redução da C_{max} em torno de 25-30%, com conseqüente atraso no tempo máximo (t_{max}) para 2,5 horas. No entanto, a quantidade de fármaco não absorvida não é significativamente relevante clinicamente (BELLORIO *et al.*, 2014; BEN-

MENACHEM, 2004; CHEW *et al.*, 2014; KIM *et al.*, 2018; KUGLER *et al.*, 2002; QIN *et al.*, 2018; SU, FENG, WEBER, 2005).

A PG penetra rapidamente a barreira hematoencefálica, pois é um substrato do sistema L-transportador, o qual é responsável pelo transporte de aminoácidos de cadeia longa através do encéfalo e do intestino, além de apresentar um volume de distribuição aparente de 0,56 L/Kg após administração por via oral. Somado a isso, este fármaco não se liga às proteínas plasmáticas (BOCKBRADER *et al.*, 2010; SU, FENG, WEBER., 2005; TASSONE *et al.*, 2007;).

O metabolismo hepático da PG é insignificante (<2%), não induzindo ou inibindo as enzimas do sistema citocromo P450 (CYP-450) (EINARSDOTTIR; BJORNSSON, 2008; KUGLER *et al.*, 2002). Pelo fato da PG não possuir metabolismo hepático significativo, não apresentando metabólitos ativos; não interagir com o sistema enzimático CYP-450 e ser eliminada praticamente na sua forma inalterada pela urina, é pouco provável que este fármaco esteja sujeito a interações farmacocinéticas de metabolismo, de acordo com Buoli, Caldiroli e Serati (2017). Além disso, a PG apresenta farmacocinética linear com doses na faixa terapêutica (BOCKBRADER *et al.*, 2011).

A PG é eliminada da circulação sistêmica praticamente inalterada, quase inteiramente por via renal. A meia-vida ($t_{1/2}$) de eliminação é de aproximadamente 3-4 horas em crianças de até 6 anos, de 4-6 horas em crianças com mais de 7 anos e 6,3 horas em adultos e, após administrações repetidas, o estado de equilíbrio em adultos é alcançado após 24-48 horas. Como a depuração (*clearance*) plasmático e o *clearance* renal são diretamente proporcionais ao *clearance* da creatinina, o ajuste de dose é necessário para pacientes com função renal reduzida, inclusive em idosos, que naturalmente apresentam redução do *clearance* de creatinina (BEN-MENACHEM, 2004; BOCKBRADER *et al.*, 2011; CHEW *et al.*, 2014; FRAMPTON, 2014; ITALIANO; PERUCCA, 2013; RANDINITIS *et al.*, 2003).

3.3 IMPORTÂNCIA DA OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PG

Como a PG apresenta meia-vida curta, múltiplas administrações podem ser necessárias, no mesmo dia, para garantir a manutenção do intervalo terapêutico, o que pode ser um fator limitante para o cumprimento adequado do tratamento,

conforme Buoli, Caldiroli e Serati (2017), já que a dor neuropática é crônica e requer tratamento longo (QIN *et al.*, 2018).

Além disso, a PG apresenta alguns efeitos adversos tais como tonturas, sonolência, edema periférico, aumento de peso, perda ou diminuição da força física (astenia), dor de cabeça e boca seca. Esses efeitos adversos são importantes e podem acabar comprometendo o sucesso do tratamento, já que em torno de 6 ou 7 em cada 10 pacientes irão experimentar pelo menos 1 efeito adverso com a PG (sonolência e tontura são comuns) (DERRY *et al.*, 2019; DWORKIN *et al.*, 2007).

Como forma de contornar a inconveniência de múltiplas administrações, em 2017 foi aprovado pelo FDA comprimidos revestidos de PG, de liberação prolongada (Lyrica CR[®]), para administração 1 vez ao dia (FDA, 2017). Mesmo que o desenvolvimento da formulação tenha sido bem sucedido, com relação à dosagem diária única, existem 4 inconvenientes que abrem espaço para melhoras: a) os comprimidos de liberação controlada (CR – do inglês *controlled release*) devem ser tomados após a refeição da noite; b) essa refeição noturna deve ser hipercalórica (800 a 1000 kcal), para garantir a mesma extensão de absorção da PG de liberação imediata; c) a formulação CR apresenta basicamente os mesmos efeitos colaterais, com a mesma incidência nos usuários que os comprimidos de liberação imediata (4% de incidência de efeitos colaterais com o uso de Lyrica CR vs. 5% de incidência de efeitos colaterais com o uso de Lyrica convencional. Efeitos colaterais mais comuns em ambos os casos: tontura, sonolência, edema periférico, náusea, boca seca, visão turva); d) a formulação CR disponível comercialmente custa 14 vezes o valor da formulação de liberação imediata (IR – do inglês *immediate release*) (PFIZER, 2018).

Com o intuito de melhorar a aderência ao tratamento, alguns estudos propuseram formulações farmacêuticas de liberação modificada, contendo PG, para administração 1 vez ao dia, tais como: administração transdérmica de solução aquosa de PG (FUKASAWA *et al.*, 2014); microesferas de PG por emulsão dupla (AYDOGAN *et al.*, 2015); comprimido de PG revestida com behenato de glicerina (JEONG *et al.*, 2015); hidrogel pH responsivo contendo PG (CEVIK, GIDAN, KIZILEL, 2015); solução líquida de PG que forma gel *in situ* e flutua no suco gástrico (MADAN, ADOKAR, DUA, 2015); comprimidos flutuantes de PG (KANWAR *et al.*, 2016); nanogel pH responsivo integrado em hidrogel para entrega controlada de PG (CINAY *et al.*, 2017), hidrogel baseado em nanocarreador contendo PG (ARAF, 2018).

AYOUB, 2017); comprimidos de liberação sustentada de PG gastro-flutuante (QIN *et al.*, 2018); comprimidos gastrorretentivos não efervescente de PG (KIM *et al.*, 2018); microesferas de PG para administração intranasal (TAKSANDE, UMEKAR, 2018); supositório de PG (YAJIMA *et al.*, 2019); microesferas de mucilagem de inhamé – alginato contendo PG (GHUMMAN *et al.*, 2019); comprimido de PG triplamente revestido (KIM *et al.*, 2020). Muitas dessas formulações foram direcionadas para o tratamento da dor neuropática.

Essas formulações desenvolvidas para administração de PG 1 vez ao dia mostraram que sistemas de liberação controlada podem ser alternativa para o aumento da aderência ao tratamento. No entanto, nenhuma das formulações apresentadas anteriormente avaliou a redução dos efeitos colaterais. Como os efeitos colaterais contribuem diretamente para a adesão ao tratamento (ECHTERHOFF, 2012; MOORE *et al.*, 2009), este é um ponto importante a ser considerado. Além disso, a maioria dos autores não testou a eficácia da formulação avaliando o seu efeito na redução da dor/nocicepção. Sendo assim, há uma importante lacuna para estudo, bem como oportunidade de melhoria no tratamento, em estudos experimentais, com possibilidade de ser levada à prática clínica.

CAPÍTULO 1 – NANOPARTÍCULA COMO FORMA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA

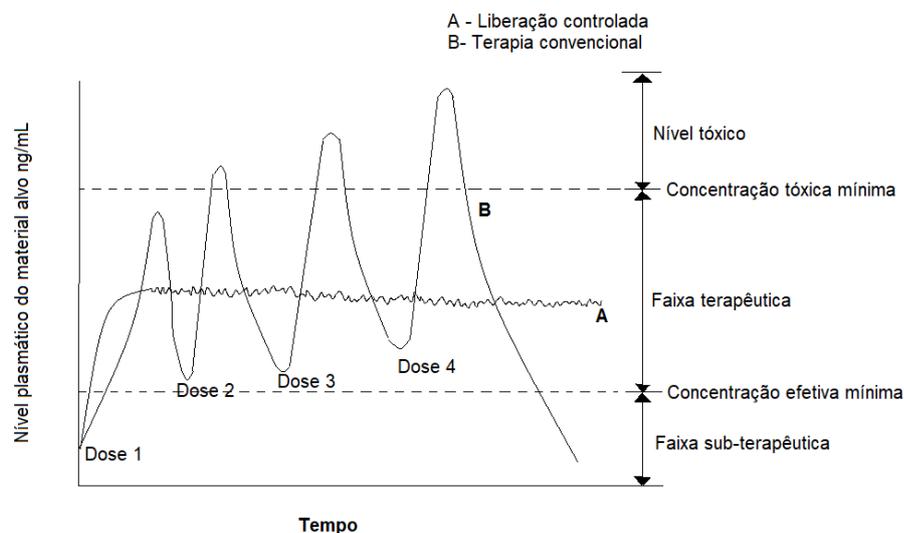
4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 FORMA FARMACÉUTICA DE LIBERAÇÃO MODIFICADA

A via oral de administração é a via mais amplamente utilizada e aceita para entrega de fármacos na população adulta, já que é uma via não invasiva e utiliza a alta capacidade absorvente do intestino para distribuir os fármacos para a circulação sistêmica (PONCHEL; IRACHE, 1998; ROGER *et al.*, 2010).

A maioria dos medicamentos disponíveis para a administração por via oral são sistemas de liberação convencionais de fármacos. Esses sistemas foram desenvolvidos para liberar o fármaco de maneira rápida, ou seja, logo após a sua administração e sem controle da velocidade da sua liberação. Para tratar condições patológicas utilizando os sistemas convencionais, a concentração do fármaco deve ser mantida acima da concentração efetiva mínima e abaixo da concentração tóxica mínima. Este intervalo é conhecido como faixa terapêutica. No entanto, como a liberação do fármaco após a administração é imediata, ocorrem picos de concentração plasmática, que declinam em seguida. Para manter a concentração do fármaco dentro da faixa terapêutica são necessárias administrações de novas doses (FIGURA 2). Esse regime de dosagens múltiplas leva, muitas vezes, ao descumprimento do tratamento por parte do paciente, além de poder causar efeitos adversos tóxicos ou secundários ou ainda um tratamento ineficaz por concentração subterapêutica (RABASCO, 1997; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012).

Figura 2 - Comparação das variações das concentrações de fármacos administrados por sistemas convencionais e por sistemas de liberação controlada



Fonte: Adaptado de Bizerra e Silva (2016).

Com o objetivo de reduzir terapias falhas, reduzir a toxicidade e os efeitos secundários, além de promover atividade prolongada e mais regular do fármaco, surgiram os sistemas de liberação modificada de fármacos. Esses sistemas permitem, de maneira geral, alteração do tempo ou da taxa de liberação da substância ativa, de forma que a liberação seja mais lenta que o sistema convencional (FIGURA 2), porém mantém a liberação do fármaco de maneira progressiva e controlada, mantendo as concentrações do fármaco dentro da faixa terapêutica por mais tempo do que os sistemas convencionais, podendo, na maioria das vezes, ser feita uma única administração. Estes sistemas podem ser particularmente úteis para o tratamento de patologias crônicas, tais como asma, hipertensão e dor crônica (RABASCO, 1997; SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012).

As formas farmacêuticas (FF) de liberação modificada podem ser subdivididas em quatro grandes grupos: liberação estendida, liberação retardada, liberação direcionada e comprimidos de desintegração oral. As FF de liberação estendida permitem redução na frequência de liberação, em pelo menos duas vezes, quando comparada com FF convencional e incluem as FF de liberação controlada, de liberação sustentada (dose inicial terapêutica seguida por liberação

baixa e contínua do fármaco) e de ação prolongada (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012).

As FF de liberação retardada liberam quantidade discreta do fármaco por tempo e a liberação demora um pouco mais do que a convencional para ocorrer e, tem como principal representante, as FF com revestimento entérico. As FF de liberação direcionada permitem que o fármaco seja liberado próximo ao sítio de ação fisiológico, podendo ser tanto de liberação imediata quanto de liberação estendida. Por fim, os comprimidos de desintegração oral são aqueles que permitem a desintegração rápida do fármaco na saliva e devem ser engolidos com pouca ou nenhuma água (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012).

Os produtos de liberação estendida possuem diversas vantagens e também desvantagens. Como vantagens, essa FF apresenta concentração plasmática do fármaco sustentada na janela terapêutica, que faz com que a resposta clínica seja prolongada e consistente. Além disso, a taxa de liberação do fármaco da FF no organismo é constante, fazendo com que as variações na concentração plasmática sejam mínimas, reduzindo assim os efeitos colaterais indesejados. Ainda, esse tipo de FF pode trazer benefício econômico ao paciente, já que uma dose do produto de liberação estendida pode custar menos do que a dose equivalente do produto que deve ser administrado diversas vezes ao longo do dia. Essas vantagens podem contribuir para maior conveniência para o paciente, que é refletida na melhor adesão ao tratamento (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012).

Como desvantagens observa-se que a remoção do fármaco no organismo em casos de efeitos adversos ou intoxicação acidental, pode ser mais difícil nas FF de liberação estendida. Como este tipo de FF pode ficar mais tempo no TGI, se ocorrerem alterações neste local, a absorção pode ser afetada. Além disso, este tipo de FF pode não ser muito útil nos casos em que o fármaco é administrado em altas doses na FF convencional, pois pode aumentar o tamanho da FF e dificultar sua administração (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012).

Existem vários exemplos de produtos de liberação estendida, tais como liberação do fármaco de uma matriz (comprimidos de matriz do tipo gel, comprimidos de matriz polimérica), *pellets* ou grânulos de liberação lenta, comprimidos de ação prolongada, produtos de troca iônica, comprimido dentro de outro comprimido (*core tablets*), microencapsulação, sistema de liberação osmótica de fármacos, sistema gastrorretentivo, sistemas de liberação transdérmica de

fármacos, formas farmacêuticas parentéricas de liberação modificada, implantes poliméricos, fármacos baseados em nanotecnologia e lipossomos (SHARGEL; WU-PONG; YU, 2012).

4.2 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO MODIFICADA BASEADOS EM NANOTECNOLOGIA

Os sistemas baseados em nanotecnologia fazem parte do grande grupo de sistemas de liberação modificada de fármacos e tem sido bastante pesquisados, pois possuem características vantajosas, tais como: liberação melhorada de fármacos pouco solúveis em água; liberação direcionada de fármacos para células ou tecidos; transcitose do fármaco através de barreiras epiteliais ou endoteliais justas; liberação de fármacos macromoleculares para ação intracelular; liberação de dois ou mais fármacos ou modalidades terapêuticas para terapia combinada; visualização de sítios específicos de liberação de fármacos combinando agentes terapêuticos com modalidades de imagem (nanodiagnóstico); leitura em tempo real *in vivo* sobre a eficácia de um agente terapêutico, além de serem capazes de promover circulação sanguínea estendida, liberando a quantidade adequada do composto ativo no sítio de ação desejado e capaz de contornar o processo endossomo-lisossomo, que é responsável pela digestão da partícula endocitada (ARACHCHIGE; RESHETNYAK; ANDREEV, 2015; FAROKHZAD; LANGER, 2009; KINGSLEY *et al.*, 2006; KREUTER, 2014).

Somado a isso, nanopartículas carreadoras de fármacos podem aumentar significativamente a sua biodistribuição no SNC; além de poder aumentar a especificidade do fármaco no seu local de ação, permite uma maior distribuição no organismo, redução de dose e redução dos efeitos adversos. Essas características são vantajosas principalmente, devido à escala nanométrica desses sistemas, muito similar às entidades biológicas (ARACHCHIGE; RESHETNYAK; ANDREEV, 2015; FAROKHZAD; LANGER, 2009; KINGSLEY *et al.*, 2006; KREUTER, 2014;).

A utilização de nanocarreadores é uma das estratégias que pode ser utilizada para melhorar solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade do fármaco administrado por via oral. A habilidade inerente do carreador em modular a

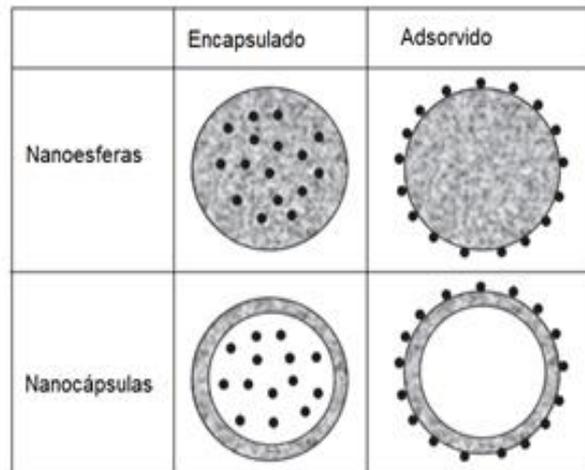
farmacocinética do fármaco incorporado, geralmente é alcançada pela proteção polimérica do sítio farmacofórico dos elementos destrutivos presentes no TGI. Esses carreadores são projetados para a liberação do fármaco, em sítio específico no intestino, para alcançar a máxima biodisponibilidade na circulação sistêmica. Assim, a absorção, distribuição e eliminação dos fármacos durante o trânsito intestinal não são determinados pelo fármaco em si, mas também pelas propriedades físico-químicas do nanocarreador, que incluem a sua composição química, o seu tamanho, sua carga superficial, sua morfologia, seu equilíbrio lipofílico-hidrofílico, as forças de interação entre o carreador e o fármaco (LI; HUANG, 2008; RUDDY; MAYER; PATRIDGE, 2009).

Existe consenso de que a nanotecnologia não representa uma simples miniaturização de objetos grandes, mas representa a preparação de nanomateriais com propriedades físico-químicas características e vantajosas com relação aos materiais comuns, porém em escala nanométrica. Sendo assim, nanomateriais são definidos como “material natural, incidental ou fabricado que contém partículas, em estado não ligado ou aglomerado, onde pelo menos 50% das partículas apresentem pelo menos uma dimensão externa com tamanho entre 1 e 100 nanômetros (nm)” (COUVREUR, 2002; RAUSCHER *et al.*, 2019).

Um dos nanomateriais que vem sendo bastante estudado com interesse biomédico são as nanopartículas (NP). Existem diversos tipos de NP, sendo a polimérica a mais utilizada (MASSERINI, 2013). É importante ressaltar que o termo nanopartícula é um termo genérico e engloba nanoesferas, nanocápsulas e também nanocompósitos, que são assim classificados de acordo com a sua composição e organização estrutural. Nanocápsulas formam uma estrutura vesicular com um núcleo líquido interno rodeado por uma parede polimérica. O fármaco pode estar no núcleo líquido (encapsulado) ou adsorvido na parede polimérica (FIGURA 3). As nanoesferas são estruturas poliméricas inteiriças, onde o fármaco pode estar misturado nessa estrutura (encapsulado) ou adsorvido na sua superfície (FIGURA 3). O polímero fica em uma conformação mais unida. Já os nanocompósitos são materiais compostos por duas fases, onde uma fase é dispersante (matriz polimérica) e a outra fase é dispersa (fármaco), no qual pelo menos uma de suas dimensões estão compreendidas na faixa nanométrica (1-1000 nm), mas mantém as propriedades dos nanomateriais (FIGURA 4). O polímero fica em uma

conformação mais solta, menos fluida que as nanoesferas (CAMARGO; SATYANARAYANA; WYPYCH, 2009; COUVREUR *et al.*, 2002).

Figura 3 - Representação esquemática de nanocápsulas e nanoesferas



Fonte: Traduzido de Damgé, Reis e Maincent (2008).

Nota: O fármaco é representado pelos pontos pretos e pode estar encapsulado ou adsorvido na superfície da nanopartícula.

Figura 4 - Representação esquemática de nanocompósito



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Nota: o fármaco é representado pelos pontos pretos e está incorporado na matriz polimérica

Para utilização de NP polimérica como carreador de fármaco, o ideal é que o polímero usado seja biodegradável e também biocompatível, reduzindo o aparecimento de efeitos indesejados, já que esse sistema não precisa ser removido do organismo após o fármaco ser completamente liberado, pois é degradado em

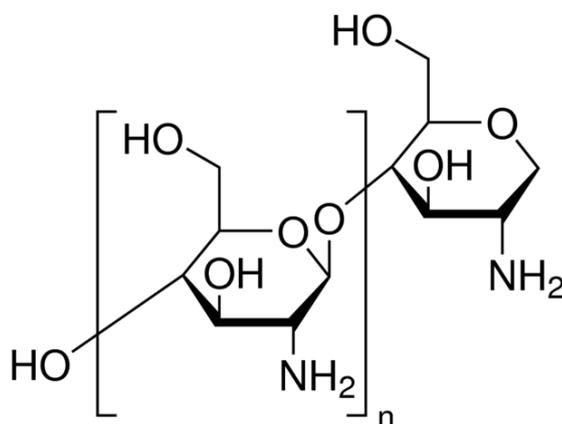
produtos atóxicos pelo próprio organismo. (DURÁN; MATTOSO; MORAIS, 2006; LIU *et al.*, 2008).

Os polímeros mais utilizados são os polilactídeos (PLA), poliglicolídeos (PGA), poli-lactídeos-co-glicolídeos (PLGA), polianinídros, policianoacrilatos, policaprolactona e os polímeros naturais como quitosana, gelatina, e alginato de sódio (BRENZA *et al.*, 2017; GUARINO *et al.*, 2017; JAIMES-AGUIRRE *et al.*, 2017; LIU *et al.*, 2012; MOHAMMED *et al.*, 2017; RAGUVARAN *et al.*, 2017; SIMS *et al.*, 2017; STELLA *et al.*, 2007; YASMIN *et al.*, 2016).

4.2.1 Quitosana (QS)

Os polissacarídeos naturais, como a quitosana (QS) (FIGURA 5), possuem alto potencial para a aplicação biotecnológica, já que possuem propriedades vantajosas, tais como estabilidade, segurança, atoxicidade, são hidrofílicos e biodegradáveis, além de serem abundantes na natureza e apresentam baixo custo de processamento (LIU *et al.*, 2008).

Figura 5 - Fórmula estrutural da quitosana



Fonte: Sigma-Aldrich (2020).

A quitosana possui estrutura cristalina altamente organizada. Dessa forma, é um polímero insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos, e tem baixa reatividade química. Além disso, apresenta alta hidrofilicidade,

principalmente devido ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica. (GONSALVES *et al.*, 2011; MUZZARELLI, 1973).

As propriedades físico-químicas da QS dependem de seu grau de desacetilação e do número médio de hidroxilas livres. Além disso, as aplicações desse biopolímero é muito atrativo pelo ponto de vista econômico, já que é obtido de fontes renováveis (ou subprodutos) (FAN *et al.*, 2012; FERREIRA; ROCHA, 2009; YUAN; HU; GAO, 2015).

Ainda, a quitosana possui outras características biofarmacêuticas importantes, tais como: sensibilidade ao pH, biocompatibilidade, baixa toxicidade, características bioadesivas e propriedades de aumento de permeabilidade. O metabolismo da mesma se dá por enzimas humanas, especialmente a lisozima, tornando-a biodegradável. As nanopartículas sintetizadas a partir de polímeros hidrofílicos, como a quitosana, com tamanho de partícula pequeno, podem se esquivar da depuração da circulação sanguínea pelo sistema de retículo endotelial, alcançando o seu alvo com maior facilidade. A QS possui efeito analgésico (protonação do grupamento amina), efeito cicatrizante de feridas e, a QS microcristalina com aplicação tópica é capaz de reduzir a fibrose extraneural durante a cicatrização do nervo lesionado e reduz a formação de neuromas pós-traumáticos (BERSCH; NIES; LIEBENDORFER, 1995; FAN *et al.*, 2012; HUANG *et al.*, 2014; MARCOL *et al.*, 2011; MUZZARELLI, 1997; OKAMOTO *et al.*, 2002; TONHI; PEPLIS, 2002; WILSON *et al.*, 2010; YUAN, HU; GAO, 2015).

Alguns autores demonstraram que a quitosana é um bom biomaterial, podendo ser utilizado para diversas formulações, auxiliando na redução da dor decorrente de diversas etiologias. Zhang *et al.* (2016) conseguiram aumentar a biodisponibilidade da lidocaína, através da liberação sustentada, utilizando nanopartículas lipídicas contendo quitosana, obtendo alívio prolongado da dor. Já Patil e Surana (2017) sintetizaram nanopartícula de quitosana revestida com polissorbatato 80, para a entrega de tapentadol no SNC, verificando que esse sistema nanoparticulado polimérico foi eficaz para a entrega do fármaco, melhorando a sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, aumentando a resposta antinociceptiva. Godfrey *et al.* (2018) desenvolveram uma nanopartícula polimérica utilizando um derivado de quitosana para encapsular o peptídeo cloridrato de leucina-encefalina, aumentando a eficácia do peptídeo, aumentando consideravelmente a resposta antinociceptiva do peptídeo. Já Wang *et al.* (2018) desenvolveram nanopartícula de

ácido hialurônico e quitosana para a entrega de curcuminoide, que apresentou resposta satisfatória para o tratamento de dor em membro inferior, ocasionada por osteoartrite. Ainda, Huang *et al.* (2018) desenvolveram hidrogel com derivado de quitosana e celulose nanocristalina, para tratar feridas de queimadura, verificando que o tempo de cicatrização foi acelerado, além de redução da dor no momento das trocas dos curativos. Dessa forma, este polissacarídeo pode ser sugerido como um interessante excipiente para administração de fármacos (PRABAHARAN, 2008).

5 MÉTODOS

5.1 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PREGABALINA

5.1.1 Teste de solubilização da PG em diversos pHs para determinação do método de preparo das nanopartículas

Para o preparo das nanopartículas foi preciso solubilizar a PG em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH=6,0 e em seguida solubilizar esta suspensão na solução ácida de quitosana, com pH final = 5,5 (teste A) ou na solução básica de ftalato de hidroxipropilmetil celulose (HPMCP - do inglês Hydroxypropyl Methylcellulose *Phthalate*), com pH final = 5,5 (teste B). Sabe-se que a faixa de pH preferível para absorção de PG na forma líquida é de 5,5 - 6,3, de acordo com a Organização Europeia de Patentes (2003). No entanto, fez-se necessário a realização de testes para a verificação da solubilização da PG em meios ácidos ou básicos em diferentes pHs, já que a PG não poderia estar na forma cristalizada/precipitada para a síntese das nanopartículas.

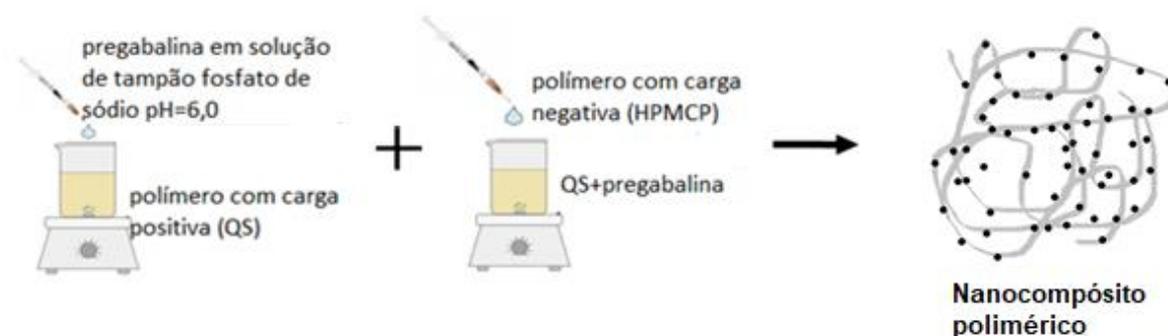
Sendo assim, pesou-se 10 mg de PG e solubilizou-se em 10 mL de solução de ácido acético 0,1 M ou 10 mL de solução de hidróxido de sódio 0,1 M. Os pHs das soluções foram ajustados com ácido acético ou com hidróxido de sódio para pHs de 4,0 - 11,0, com incrementos de 0,5. Em seguida, as soluções foram agitadas em agitador horizontal por 6 horas na velocidade de 130 rotações por minuto (rpm), seguidas por centrifugação (20 minutos a 1073 g) e a posterior observação da formação de precipitados.

5.1.2 Método de preparo das nanopartículas poliméricas com PG

As nanopartículas poliméricas com PG foram preparadas com base no método de geleificação ionotrópica, utilizando QS (FIGURA 5) e como agente reticulante, HPMCP, adaptado de Calvo *et al.* (1997). As concentrações de quitosana e agente reticulante foram escolhidas de acordo com estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, conforme Barbi *et al.* (2014). As nanopartículas foram preparadas da seguinte maneira: primeiramente preparou-se solução de quitosana (4 mg/mL) em solução de ácido acético 0,1 M com o pH de 5,5. Também foi preparada solução de HPMCP (2 mg/mL) em solução de hidróxido de sódio 0,1 M com pH de 5,5. A solução de PG (8 mg/mL) foi preparada através da diluição de PG em tampão fosfato de sódio 0,2 M pH=6,0. As soluções foram então gotejadas com auxílio de uma seringa sob agitação magnética por 30 minutos a 800 rpm, em temperatura ambiente (FIGURA 6), na seguinte ordem: primeiramente gotejou-se a solução de PG sobre a solução ácida de quitosana e em seguida gotejou-se a solução básica de HPMCP, de forma que se adicionou 3,18 partes de PG:3 partes de QS: 1 parte de HPMCP (% m/m/m). As nanopartículas vazias (NP VAZ), ou isentas de PG, foram preparadas da mesma maneira utilizando solução de QS, solução de HPMCP e tampão fosfato de sódio 0,2 M pH=6,0.

Para alguns testes de caracterização, as NPs foram liofilizadas.

Figura 6 - Representação esquemática do preparo da NP



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

5.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

5.2.1 Determinação do tamanho das partículas, do índice de polidispersão, do potencial zeta e do pH

Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico e do índice de polidispersividade (PDI) por dispersão dinâmica de luz (DLS - do inglês *dynamic light scattering*), utilizou-se o ângulo de incidência da luz em 173°. As medidas foram realizadas de forma direta, sem diluição das amostras, em temperatura ambiente (25°C), colocando as amostras em banho de ultrassom por 2 minutos, antes da análise. O resultado foi expresso pela média de três medidas consecutivas.

Para a determinação do diâmetro hidrodinâmico por análise de rastreamento de nanopartícula (NTA - do inglês *nanoparticle tracking analysis*), as medidas foram realizadas de forma direta, diluindo as amostras em água destilada com um fator de diluição de 5000, em temperatura ambiente (25°C).

O potencial zeta foi avaliado utilizando-se a técnica de espalhamento de luz eletroforético. As medidas foram realizadas de forma direta, sem diluição das amostras, em temperatura ambiente (25°C). O resultado foi expresso pela média de três medidas consecutivas.

O pH foi medido diretamente nas dispersões de nanopartículas, utilizando um pHmetro digital, com eletrodo de pH blindado semissólido e líquido.

5.2.3 Avaliação da taxa de associação da PG à NP

As NP PG foram diluídas em diluente da NP na proporção de 1:10 (%v/v) (diluente= 3 partes de solução de ácido acético 0,1 M, 1 parte de solução de hidróxido de sódio 0,1 M e 3,18 partes de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH=6,0 (% m/m/m)) e homogeneizadas em vórtex por 1 minuto, com volume final de 1 mL. Em seguida, foram centrifugadas a 5000 g por 15 minutos. O sobrenadante (990 µL) foi retirado e a este, adicionou-se 1000 µL de acetona, para separar a quitosana da PG, já que ambas as substâncias possuem similaridade estrutural (FIGURA 1 e 5)

e precipitação diferenciada neste solvente. Logo após, a mistura foi homogeneizada em vórtex por 1 minuto e centrifugada a 17800 g por 30 minutos. Após centrifugação, 1990 µL do sobrenadante foram retirados e secos sob vácuo a 80°C. O resíduo seco foi ressuspenso em 200 µL de fase móvel e 20 µL foram analisados por HPLC-UV, para a determinação da quantidade de fármaco livre.

A determinação da taxa de associação foi medida de forma indireta e calculada pela Equação 1. O resultado foi expresso como média (n=3).

$$\% \text{ taxa de associação} = (\text{quantidade de pregabalina adicionada na NP} - \text{quantidade de pregabalina livre}) * 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

A quantidade de PG adicionada na NP foi obtida pela média das análises cromatográficas de uma solução de PG 8 mg/mL, em triplicata, preparadas da mesma maneira que as NP PG, porém utilizando somente os diluentes dos polímeros.

A quantidade de PG em livre foi obtida pela análise cromatográfica do sobrenadante de NP PG, descontada da média das análises cromatográficas do sobrenadante de três NP VAZ. A NP VAZ foi processada da mesma maneira que as NP PG

5.2.3.1 Método cromatográfico para a avaliação da taxa de associação da PG na NP

O método de análise foi baseado no método disposto na Farmacopeia Indiana (THE INDIAN PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2010) e foi validado de acordo com a legislação vigente RDC 166/2017 (BRASIL, 2017) (APÊNDICE B).

Resumidamente, foi utilizada como fase móvel uma mistura de água e acetonitrila (95:5% v/v), fluxo de 1 mL/min, e como fase estacionária, foi utilizada coluna de C18 (150 mm x 4,6 mm x 05 µm). Foi utilizada detecção UV em 190 nm. O tempo de análise no equipamento foi de 14 minutos, com volume de injeção de 20 µL. Para a confecção das curvas analíticas, preparou-se soluções de PG em fase móvel, com concentrações variando de 0,2 a 2 mg/mL, que foram convertidas em massa de PG, compreendidas entre 0,04 - 0,4 mg de PG.

5.2.4 Análise morfológica das nanopartículas

A análise morfológica das NPs foi realizada por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG). Foi utilizada resolução de 4,7 nm a 2.00 kV em alto vácuo, magnificação de 25,00 vezes e detector de elétrons secundários (SE).

As amostras (dispersão de nanopartículas) foram diluídas em água ultrapura, utilizando fator de diluição de 100. As amostras foram então gotejadas sobre suporte de silício previamente limpo, secas em sistema de secagem sob vácuo e metalizadas com carbono. As amostras foram então analisadas.

5.2.5 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As possíveis interações entre a PG e os polímeros no sistema nanoestruturado foram analisados por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, com varredura de 4000 a 600 cm^{-1} , 64 scans com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando a técnica de *dropping* sobre pastilhas de brometo de potássio (KBr).

As amostras de dispersão de nanopartículas foram concentradas 4 vezes; gotejou-se sob uma pastilha de KBr previamente preparada, 3 gotas de cada amostra (15 μL cada gota), com intervalo de 30 minutos entre as gotas. Entre as gotas, a pastilha foi colocada em dessecador contendo sílica, sob vácuo. Após a adição das 3 gotas, a pastilha foi colocada para secar em dessecador por 19 horas. Após a secagem, a pastilha foi analisada. As pastilhas contendo as soluções dos polímeros e do fármaco foram preparadas da mesma forma.

5.2.6 Análises térmicas

5.2.6.1 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A análise de DSC das amostras liofilizadas de NPs e seus componentes também liofilizados foi realizada utilizando o calorímetro exploratório diferencial, calibrado com padrão de Índio, colocando-se a amostra (5-7 mg) em cadinho de alumínio fechado, com tampa perfurada, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (50 mL/min) com fluxo de calor de 10°C/min na faixa de aquecimento de 25°C a 400°C.

5.2.6.2 Termogravimetria (TG)

As medidas termogravimétricas foram obtidas em um módulo termogravimétrico simultâneo TG/DTA, calibrado com padrão de Índio, usando massa de amostras liofilizadas compreendidas na faixa de 3,4 - 8,2 mg (dependendo da granulometria da amostra) em cadinhos de alumínio e razão de aquecimento de 10°C/min. As análises foram realizadas entre 30°C e 550°C. A atmosfera do forno foi saturada com nitrogênio, à vazão constante de 50 mL/min. Os parâmetros utilizados foram baseados no estudo de Mahmoud *et al.* (2014).

5.2.7 Difração de raios X (DRX)

Para obtenção dos dados de difração, as medidas foram realizadas em difratômetro de pó, usando radiação $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$) e monocromador de grafite, funcionando a 40 kV e 30 mA. Os difratogramas foram obtidos no intervalo angular (2θ) de 3,00 a 35,00°, passo de 0,02°, velocidade de 1°/min, com fenda de 10 mm.

5.2.8 Estabilidade

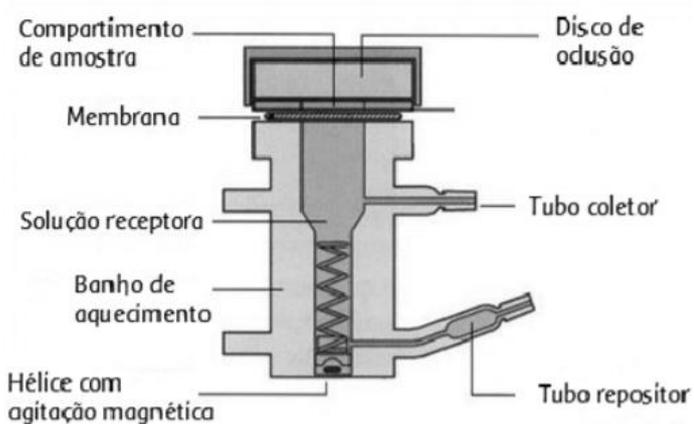
A estabilidade das nanopartículas, recém-preparadas em dispersão aquosa foi avaliada através de: tamanho e potencial zeta das amostras. As amostras (dispersão de nanopartículas) foram armazenadas ao abrigo da luz, vedadas, em temperatura ambiente (25°C) por 30 dias, onde reavaliou-se o tamanho e o potencial zeta, colocando as amostras em banho de ultrassom por 15 minutos antes das análises.

Os resultados foram comparados entre si pelo teste t de Student, para dados não pareados, bicaudal. Intervalo de confiança de 95% e nível de significância fixado em 5%.

5.3 LIBERAÇÃO *IN VITRO*

A liberação foi investigada usando células do tipo Franz (FIGURA 7), cobertas com membrana de diálise de acetato de celulose regenerada. Foram adicionados 500 µL da amostra (n=3). O ensaio foi realizado a 37°C, agitação de 300 rpm, sob condições sink (a concentração do soluto não ultrapassou mais do que 10-15% de sua solubilidade máxima no meio de dissolução). O meio receptor foi constituído por solução de ácido clorídrico 0,1 M pH=2,0, na primeira etapa, com duração total de 2 horas, e por solução tampão fosfato de sódio 0,2 M pH=6,8, na segunda etapa, com duração total de 10 horas conforme especificado na Farmacopeia Brasileira (teste de dissolução: procedimento para formas farmacêuticas de liberação retardada -método A) (BRASIL, 2019). Para a troca de meios, sem desmontar o sistema, o procedimento foi realizado como descrito na Farmacopeia Brasileira, onde 1 volume de meio receptor HCl foi removido e 1 volume de solução de fosfato de sódio tribásico 0,2 M foi adicionado, formando assim um tampão de fosfato de sódio 0,2 M com um pH final de 6,8. O ajuste do pH não foi necessário, uma vez que esta troca tinha sido previamente testada pela autora. Para as coletas seguintes (4-12 h), foi utilizada a solução tampão de fosfato de sódio 0,2 M pH=6,8 previamente preparada. Foram retiradas alíquotas (1 mL) após 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 e 12 h. As alterações na composição do meio foram feitas de modo a simular as condições do estômago e do intestino.

Figura 7 - Representação esquemática da célula de Franz



Fonte: Serafim *et al.* (2013).

As amostras foram secas sob vácuo, a 80°C, ressuspendidas em 200 µL de fase móvel e analisadas (20 µL), por HPLC-UV, conforme método descrito no item 5.2.3.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 DESENVOLVIMENTO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PG

6.1.1 Teste de solubilização da PG em diversos pHs para determinação do método de preparo das nanopartículas

O teste de solubilização foi preparado e realizado de acordo com o item 5.1.1. Posteriormente observou-se o aspecto das soluções. Todas as soluções apresentaram-se límpidas, sem precipitação, o que indica que a PG foi totalmente solúvel tanto em pHs ácidos quanto em pHs básicos.

Este resultado observado é compatível com os relatos da literatura, que afirmam que a PG é livremente solúvel em água e em soluções ácidas e básicas (MONTEVALE, 2007).

Como a PG está zwitteriônica em pH=5,5, de acordo com National Center for Biotechnology Information (2016) e não apresentou problemas de solubilização, esta pode ser solubilizada tanto na solução ácida de QS ou na solução básica de HPMCP.

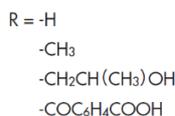
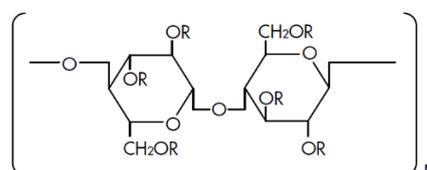
6.1.2 Preparo das nanopartículas poliméricas com PG

Agentes reticulantes, tais como glutaraldeído, etilenoglicol diglicidil éter, tripolifosfato, HPMCP, ácido sulfúrico e epicloridrina, são usados para aumentar a estabilidade química e a resistência mecânica da QS (CUI *et al.*, 2008; HSIEN; RORRER, 1997; KUMBAR; KULKARNI; AMINABHVI, 2002; LAUS *et al.*, 2006; MAKHLOF *et al.*, 2011; MONTEIRO JR.; AIROLDI, 1999; OSHITA *et al.*, 2003).

O reticulante HPMCP (FIGURA 8) foi escolhido neste estudo pelas suas propriedades, tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade, facilidade de obtenção (é um derivado da celulose), e proteção contra a degradação pelo baixo

pH do suco gástrico (EHRICH; HÖH; KREINER, 1990; FERREIRA; ROCHA, 2009; JIMÉNEZ *et al.*, 2010; KOKUBO *et al.*, 1997; WANG *et al.*, 2017).

Figura 8 - Fórmula estrutural do HPMCP



Fonte: Shin-Etsu (2018).

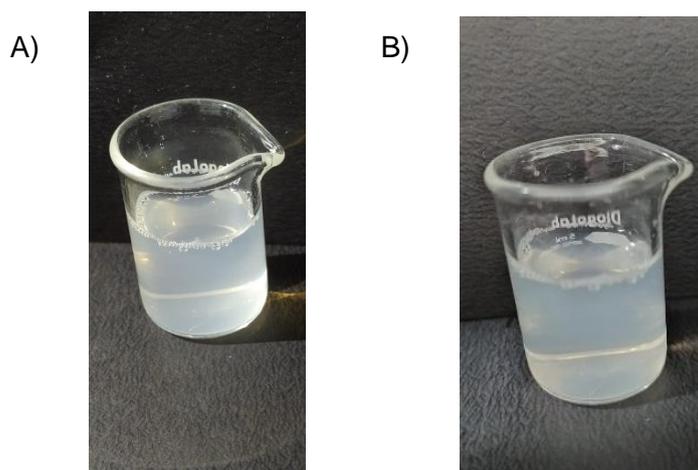
AS NPs de quitosana podem ser preparadas por geleificação ionotrópica, coacervação e métodos de coalescência de gotas da emulsão modificada, de acordo com Santos (2010). O método de geleificação ionotrópica foi escolhido neste trabalho, por ser um método de obtenção de NP utilizando condições brandas e em curto período de tempo, além de não utilizar solventes orgânicos. A técnica de preparo, proposta inicialmente por Calvo *et al.* (1997), envolve processo de geleificação ionotrópica, no qual ocorre a mistura de duas fases aquosas à temperatura ambiente. Uma fase contém o polissacarídeo QS (catiônico) e a outra contém um polímero aniônico (nesse caso HPMCP); ao serem misturadas, interagem de forma eletrostática, formando um gel e precipitando as partículas. Os carreadores nanoparticulados obtidos possuem características hidrofílicas, já que são utilizados polímeros hidrofílicos para a sua preparação (CALVO *et al.*, 1997). Por ser um método simples de preparo, utilizando polímeros naturais de fácil obtenção, possibilita que a formulação resultante tenha um custo mais baixo, quando comparado com os comprimidos de liberação controlada de pregabalina (Lyrica CR®).

A partir do resultado obtido através do teste de solubilidade da PG (item 6.1.1) foi possível verificar que a PG poderia ser solubilizada tanto em solução ácida de

quitosana quanto em solução básica de HPMCP. Sendo assim, testou-se o desenvolvimento das nanopartículas poliméricas com PG, utilizando a técnica de reticulação polieletrólítica, de duas formas diferentes:

Para estes testes, a PG foi gotejada em solução de QS, com posterior adição do HPMCP (teste A) ou a PG foi gotejada em solução de HPMCP e esta mistura gotejada sobre a solução de QS (teste B). Tanto em A quanto em B, as suspensões se apresentaram opalescentes (FIGURA 9), que é o aspecto indicativo de formação de nanopartículas, conforme Calvo *et al.* (1997). Independentemente da ordem de gotejamento, o pH, o tamanho e o potencial zeta não se modificaram significativamente, apresentando para o teste A: pH médio = 5,7, tamanho médio = 425 nm, potencial zeta médio = +19 mV e para o teste B: pH médio = 5,7, tamanho médio = 413 nm, potencial zeta médio = +20 mV. Sendo assim, tanto A quanto B, poderiam seguir para os demais testes de caracterização, no entanto, pelo método de preparo A ser mais simples, esse foi o método de escolha para dar continuidade aos testes.

Figura 9 - Aspecto das nanopartículas no teste A e no teste B



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Legenda: A) Teste A – PG gotejada sobre QS e adição posterior de HPMCP; B) Teste B – PG gotejada sobre HPMCP e adição dessa mistura em QS.

6.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

6.2.1 Tamanho da partícula, índice de polidispersão, potencial zeta e pH das nanopartículas

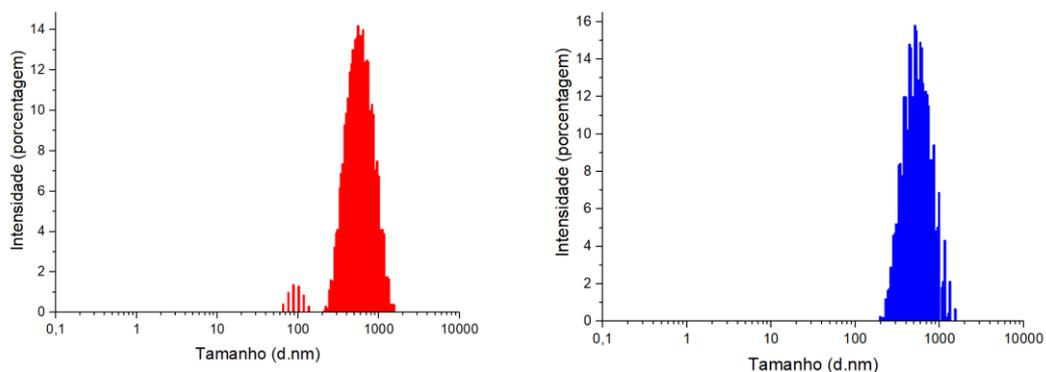
Pela Tabela 1 é possível observar que o diâmetro médio das NPs PG pela técnica de DLS foi de 432 ± 20 nm; o PDI médio foi de $0,238\pm 0,001$; o potencial zeta médio foi de $+19,0\pm 0,9$, e o pH médio foi de $5,7\pm 0,06$. Também, pela Tabela 1, foi possível observar que o diâmetro médio das NPs VAZ pela técnica de DLS foi de 425 ± 24 , o PDI médio foi de $0,234\pm 0,016$, o potencial zeta médio foi de $+18,6\pm 1,0$ e o pH médio foi de $5,6\pm 0,08$. Pelo Gráfico 1, foi possível observar a distribuição do tamanho das nanopartículas em função da intensidade: em A temos NP PG e, em B temos NP VAZ.

Tabela 1 - Tamanho das partículas (DLS e NTA), PDI, pH e potencial zeta dos lotes de NP PG e NP VAZ

NP	Tamanho médio (nm) - DLS	PDI médio	Tamanho médio (nm) - NTA	pH médio	Potencial zeta médio (mV)
NP PG (A)	434 ± 20	$0,238\pm 0,001$	193	$5,7\pm 0,06$	$+19,0\pm 0,9$
NP VAZ (B)	425 ± 24	$0,234\pm 0,016$	174	$5,6\pm 0,08$	$+18,6\pm 1,0$

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Gráfico 1 - Distribuição do tamanho das NP por intensidade analisado por DLS



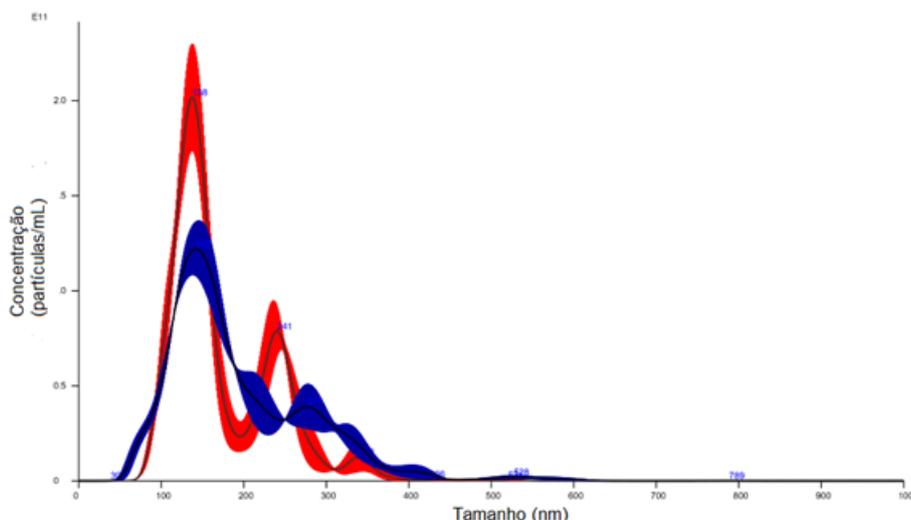
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: A) NP VAZ B) NP PG. O histograma representa 3 análises de cada amostra. Estas mesmas amostras foram utilizadas para a análise por NTA.

Pela técnica de DLS, pode-se perceber que o diâmetro médio das NP PG e NP VAZ foi inferior a 450 nm e, apresentou valores próximos entre si, o que mostra que a presença do fármaco não interfere significativamente no tamanho da NP.

Pelo Gráfico 2, é possível observar a distribuição dos diferentes tamanhos de partículas pela técnica de NTA, onde a maior parte das partículas (NP VAZ ou NP PG), cerca de 70%, encontram-se entre 100 e 200 nm (tamanho médio: NP VAZ = 174 nm e NP PG=193 nm), mas também apresentam população com tamanho entre 200 - 300 nm e entre 300 - 500 nm (cerca de 30%). Essas populações com tamanho maior são condizentes com os resultados obtidos pela técnica de DLS, já que nesta última técnica o ângulo de incidência do laser é fixo, as partículas maiores dispersam mais luz e acabam sendo detectadas como população monodispersa (TSCHARNUTER, 2000).

Gráfico 2 - Distribuição do tamanho das partículas pela técnica de NTA



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: o traço vermelho representa a NP VAZ e o traço azul representa a NP PG.

Pelos testes de DLS e NTA é possível observar que as técnicas são complementares e são capazes de determinar o diâmetro hidrodinâmico (tamanho) das partículas através do movimento Browniano, caracterizando as partículas do presente estudo como nanocompósitos, de acordo com Camargo, Satyanarayana e Wypych (2009). Sabe-se que partículas com tamanho inferior a 500 nm conseguem atravessar a barreira hematoencefálica para exercer a ação no SNC (APOLINÁRIO *et al.*, 2020; MASSERINI, 2013). Sendo assim, as partículas do presente estudo apresentam tamanho reduzido quando comparado com outros estudos que propuseram microesferas contendo PG (AYDOGAN *et al.*, 2015; GHUMMAN *et al.*, 2019; TAKSANDE; UMEKAR, 2018), além de ser adequado para o objetivo proposto.

Para a avaliação da dispersividade das partículas (PDI), tanto para as NPs PG quanto para as NPs VAZ, o valor médio obtido foi inferior a 0,250, estando abaixo do limite máximo aceitável para NPs poliméricas que é de 0,300, o que nos informa que a distribuição das NPs preparadas pode ser considerada homogênea e tem distribuição estreita de tamanho. No entanto, Ibrahim *et al.* (2019)

desenvolveram colírio de mini emulsões contendo PG, no qual o PDI encontrado foi inferior a 0,38 e a distribuição de tamanho também foi considerada homogênea. Já que se sabe que as cadeias de polímeros podem não estar enoveladas e acabar dispersando a luz, interferindo na medida geral de tamanho (KÜLKAMP *et al.*, 2009; LIU; WU, 2010).

O potencial zeta médio das NPs PG e NPs VAZ foi próximo a +20 mV. Sabe-se que os polímeros presentes na formulação determinam a carga da partícula (PEDREIRO, 2015; RUELA *et al.*, 2016). Sendo assim, o resultado de potencial zeta positivo está associado à quitosana presente na matriz polimérica, indicando cargas do grupamento amina ionizados, já que o pH da amostra (5,7) é menor que o pKa da quitosana (GONSALVES *et al.*, 2011). Ibrahim *et al.* (2019) também encontraram potencial zeta positivo, quando avaliaram mini emulsão coberta por quitosana contendo PG. Além disso, em nosso estudo, os valores de potencial zeta da NP PG ficaram próximos ao da NP VAZ, sugerindo que a PG está emaranhada na matriz polimérica, uma vez que se os grupos ionizáveis da PG estivessem fora da matriz polimérica, as suas respectivas cargas poderiam interferir na carga final da partícula.

O pH médio da NP PG foi de 5,7 e o da NP VAZ foi de 5,6. Foi possível perceber que os valores de pH não foram significativamente diferentes, indicando que a presença da PG não interfere no pH final da formulação. Além disso, esse pH das formulações de NP PG pode ser considerado adequado para absorção de PG por via oral, uma vez que se sabe que este fármaco é facilmente absorvido por esta via de administração em faixa de pH entre 5,5 - 6,3 (ORGANIZAÇÃO EUROPEIA DE PATENTES, 2003).

Ressalta-se que o tamanho, polidispersividade das partículas e o pH são importantes, uma vez que esses parâmetros afetam a liberação, a absorção e, conseqüentemente, a biodisponibilidade do fármaco (KHAFAGY *et al.*, 2007; PREZOTTI, 2013).

6.2.2 Avaliação da taxa de associação de PG à NP

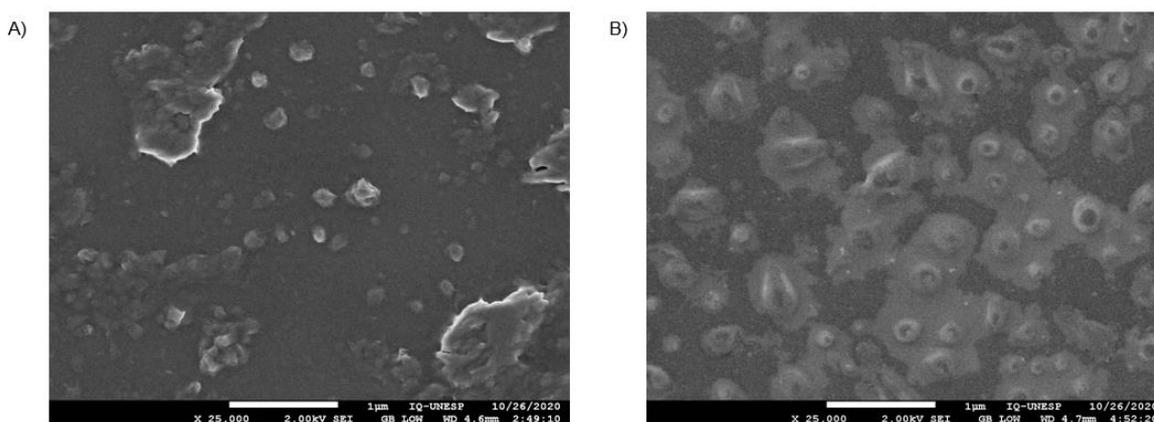
A taxa de associação foi calculada de acordo com o item 5.2.3. Após a quantificação da fração livre por HPLC-UV, foi possível estimar que a taxa de associação da PG à NP foi de 44,40%. Esta taxa de associação estimada no presente estudo é relativamente menor do que as taxas encontradas por Aydogan *et al.* (2015) (taxa variando de 41 a 69,70%, de acordo com a composição das microesferas) e Taksande e Umekar (2018) (taxa variando de 50,91 a 84,34%, de acordo com a composição das microesferas), quando propuseram o preparo de microesferas de PG. No entanto, a taxa de associação deste estudo está bem próxima da eficiência de encapsulação de niossomas contendo PG proposto por Arafa e Ayoub (2017). Essa diferença de taxa de associação pode ter ocorrido por diferenças no método de síntese, além de a proporção de fármaco estar maior do que a proporção de polímero (3,18 partes de PG: 3 partes de QS: 1 parte de HPMCP, % m/m/m), no presente estudo. Como foi relatado por Taksande e Umekar (2018), a eficiência de encapsulação da PG aumenta com o aumento da razão fármaco-polímero.

No entanto, a fração de PG que não está associada à NP desempenha papel importante para a obtenção de concentração plasmática terapêutica inicial de PG.

6.2.3 Análise morfológica das nanopartículas

As amostras foram preparadas para análise de acordo com o item 5.2.4 e a morfologia pode ser observada na Figura 10.

Figura 10 - MEV-FEG das NP PG (A) e NP VAZ (B)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Foi possível observar que tanto a NP PG quanto a NP VAZ apresentam morfologia esférica. No entanto, não foi possível observar a característica da superfície das NPs. Além disso, foi possível observar, que devido ao intumescimento dos polímeros em meio aquoso, como relatado no item 6.2.1, as partículas NP VAZ se apresentam com halo mais claro ao redor das partículas (FIGURA 10 B), sugerindo que as partículas estão se desfazendo, por ficarem em meio aquoso por 30 dias. Esse halo ao redor das NP VAZ não foi observado na NP PG (FIGURA 10 A), sugerindo que as partículas ficam mais estáveis com a adição da PG.

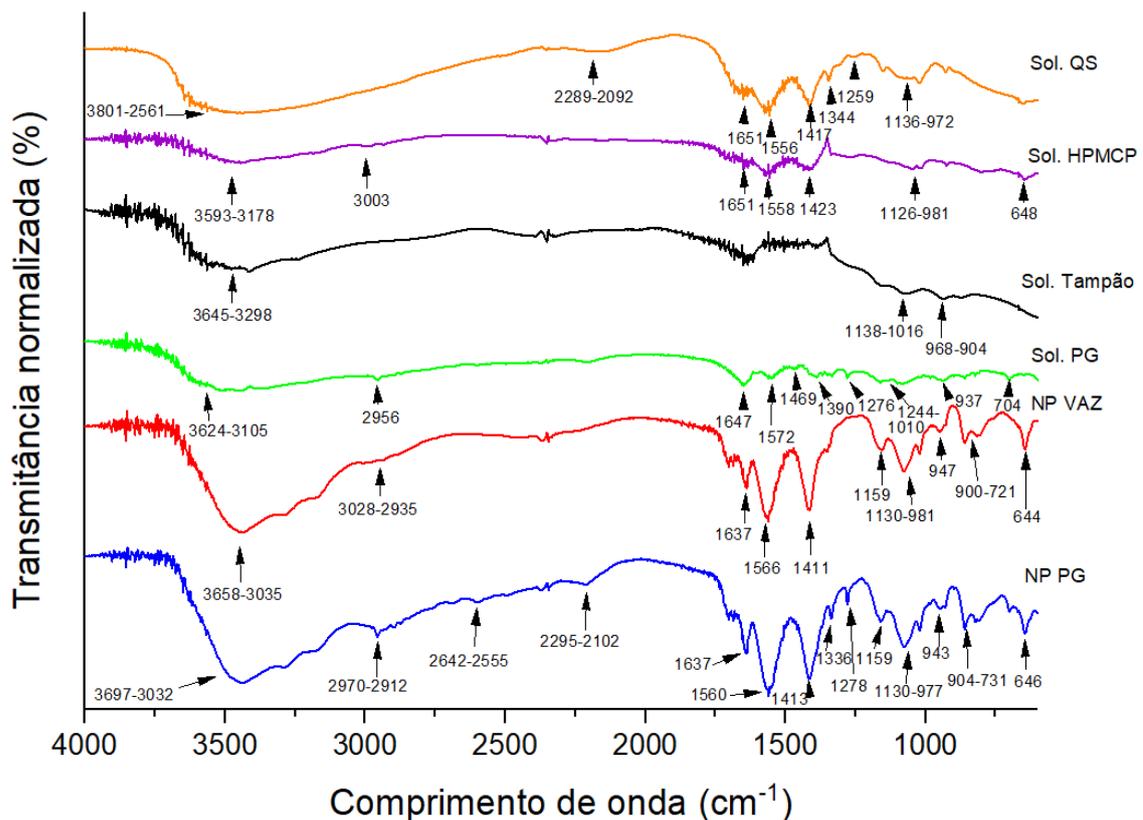
Através das análises das imagens de MEV-FEG das partículas, foi possível observar que as NP PG apresentaram tamanho entre 150 - 210 nm e as NP VAZ apresentaram tamanho entre 130 - 370 nm, corroborando com o resultado encontrado pela análise de tamanho por NTA (item 6.2.1).

Como foi relatado por Powers *et al.* (2006), partículas esféricas apresentam maior área de superfície, quando comparadas com partículas disformes; isto favorece maior contato com a superfície do epitélio intestinal e conseqüentemente aumenta a absorção. Como as nanopartículas apresentaram-se esféricas e com tamanho adequado, é indicativo que possuem características adequadas para absorção por via oral.

6.2.4 Análise FTIR

A Figura 11 mostra os espectros de FTIR das soluções utilizadas para o preparo das NPs e das soluções de NPs. A Tabela 2 mostra as bandas referentes a cada grupo funcional de cada amostra.

Figura 11 - FTIR por dropping em KBr das nanopartículas e componentes da formulação



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Tabela 2 - Eventos observados nos espectros de FTIR

Evento observado	Sol. de quitosana (cm ⁻¹)	Sol. de HPMCP (cm ⁻¹)	Sol. Tampão (cm ⁻¹)	Sol. de Pregabalina (cm ⁻¹)	Nanopartícula vazia (cm ⁻¹)	Nanopartícula com pregabalina (cm ⁻¹)
Vibração de estiramento O-H	3801-2561	3593-3178	3645-3298	3624-3105	3658-3035	3697-3032
Vibração de estiramento O-H/ ligação de hidrogênio forte					3028-2935	2642-2555
Vibração de flexão O-H fora do plano		648		937	947; 644	943; 646
Vibração de estiramento C=O de ácido carboxílico		1651		1647	1637	1637
Estiramento assimétrico COO ⁻		1558				
Estiramento simétrico COO ⁻		1423				
Vibração de estiramento C-O-C	1136-972	1126-981			1159	1159
Vibração de estiramento C-O de ácido carboxílico no plano				1276		1278
Vibração de flexão de O-H de ácido carboxílico no plano					1411	1413
Vibração de estiramento N-H	3801-2561			3624-3105	3658-3035	3697-3032
Vibração de estiramento C-N	1259			1244-1010	1130-981	1278; 1130-977
Vibração de flexão e oscilação torcional de NH ₃ ⁺	2289-2092					2295-2102
Vibração de flexão assimétrica de NH ₃ ⁺	1651					
Vibração de flexão simétrica de NH ₃ ⁺	1556					
Vibração de flexão em tesoura de NH ₂				1572	1566	1560
Vibração de oscilação N-H				704	900-721	904-731
Vibração de estiramento CH ₃		3003		2956	3028-2935	2970-2912
Vibração de dobramento de CH ₂ de alceno	1417	1423		1469	1411	1413
Vibração de flexão C-H	1344			1390		1336
Vibração de estiramento P=O			1138-1016	1244-1010	1130-981	1130-977
Vibração de estiramento P-OH			968-904	937	947	943

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: célula em branco indica que o evento não foi observado

O espectro da solução de quitosana (FIGURA 11 e TABELA 2) apresentou bandas características aos grupamentos O-H, N-H, C-N, C-O-C, NH_3^+ , CH_2 e C-H, que estão condizentes com a estrutura da quitosana em meio ácido, a qual fica protonada no grupamento amina (MUZZARELLI, 1973), conferindo característica catiônica ao polímero. Além disso, as bandas encontradas condizem com a literatura (KIILL, 2012; LI; HEIN; WANG, 2013; NAVES, 2018).

O espectro da solução de HPMCP (FIGURA 11 e TABELA 2) apresentou bandas características aos grupamentos O-H, ânion carboxilato (COO^-), C-O-C e CH_2 , que estão condizentes com a estrutura do HPMCP em meio alcalino, o qual fica desprotonado no grupamento ácido carboxílico, conferindo característica aniônica ao polímero. Além disso, as bandas encontradas estão de acordo com a literatura (PEDREIRO, 2015; WANG *et al.*, 2005).

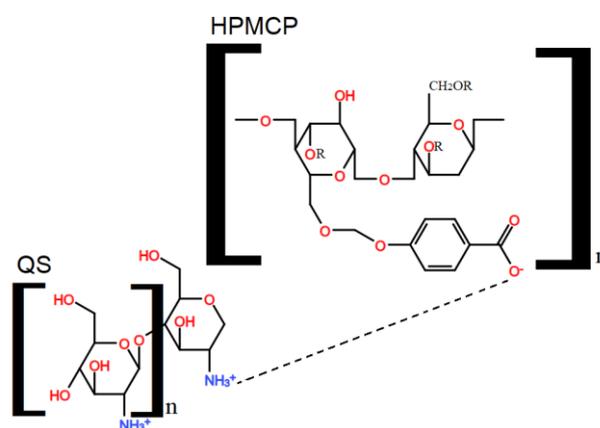
O espectro da solução tampão (FIGURA 11 e TABELA 2) apresentou bandas características aos grupamentos O-H, já que é solução aquosa, P=O e P-OH, referentes ao fosfato, já que o tampão é um tampão fosfato. As bandas encontradas estão condizentes com a literatura (SILVERSTEIN *et al.*, 2014)

O espectro da obtido da solução de PG (FIGURA 11 e TABELA 2) apresentou bandas características aos grupamentos O-H, N-H, NH_2 , C-N, C=O de ácido carboxílico, CH_3 , CH_2 , C-H, P=O e P-OH, que estão condizentes com a literatura (AYDOGAN *et al.*, 2015; HARIKRISHNAN; BHOOPATHY, 2014; SULTANA *et al.*, 2015). Como a solução de PG foi preparada em tampão fosfato de sódio com $\text{pH}=6,0$, a PG se encontra na forma zwitteriônica, já que seus $\text{pKa}'\text{s}$ são 4,2 e 10,6 (PUBCHEM, 2005), sendo esperado encontrar os grupamentos NH_3^+ e COO^- . No entanto, uma vez que a gota é depositada sob a pastilha de KBr e seca, a PG se cristalizou na sua forma mais estável, que é a sua forma não iônica, o que justifica o aparecimento das bandas referentes aos grupamentos NH_2 e COOH .

O espectro da NP VAZ (FIGURA 11 e TABELA 2) apresentou bandas características aos grupamentos O-H, N-H, NH_2 , C-N, C-O-C, C=O de ácido carboxílico, CH_2 , CH_3 , P=O e P-OH. A banda entre $3658\text{-}3035\text{ cm}^{-1}$ referente ao estiramento O-H, sobreposta ao estiramento N-H, apresenta-se deslocada e mais intensa que os polímeros QS e HPMCP isolados, indicando complexação polimérica da QS com o HPMCP, através de ligações de hidrogênio entre o grupamento NH_3^+ e COO^- , respectivamente. As ligações de hidrogênio podem, ainda, ser evidenciadas pela banda entre $3028\text{ e }2935\text{ cm}^{-1}$. Ainda, observa-se banda em 1637

cm^{-1} , referente ao dobramento angular de N-H da QS sobreposta à C=O em ressonância com anel aromático do HPMCP, indicando mais uma vez a formação da matriz polimérica. Somado a isso, ocorre o aparecimento de banda de absorção na região de 1566 cm^{-1} referente à NH_2 , indicando que provavelmente, os grupamentos amins da QS interagiram com os grupamentos carbonilas do HPMCP e formando NH_2 , o que é indicativo mais uma vez da formação do complexo polieletrólítico (FIGURA 12). Também foi possível observar banda na região de 1411 cm^{-1} , mais intensa e deslocada dos polímeros isolados, referente à deformação angular do O-H (QS e/ou HPMCP) sobreposta ao grupamento CH_2 , indicando que a conformação dos polímeros isolados foi alterada, deixando o grupamento CH_2 mais exposto, sendo mais um indicativo da interação entre os polímeros. Também é possível observar banda na região de 1130 a 981 cm^{-1} , referente ao grupamento P=O do fosfato sobreposta ao grupamento C-N e banda em 947 cm^{-1} , referente ao grupamento P-OH do tampão fosfato sobreposta ao grupamento C=O, indicando que o tampão não atua na complexação polieletrólítica da NP. Esses achados vão de encontro aos da literatura (KIILL, 2012; LI; HEIN; WANG, 2013; NAVES, 2018; PEDREIRO, 2015; ROSCA *et al.*, 2011;).

Figura 12 - Representação da complexação polieletrólítica entre QS e HPMCP

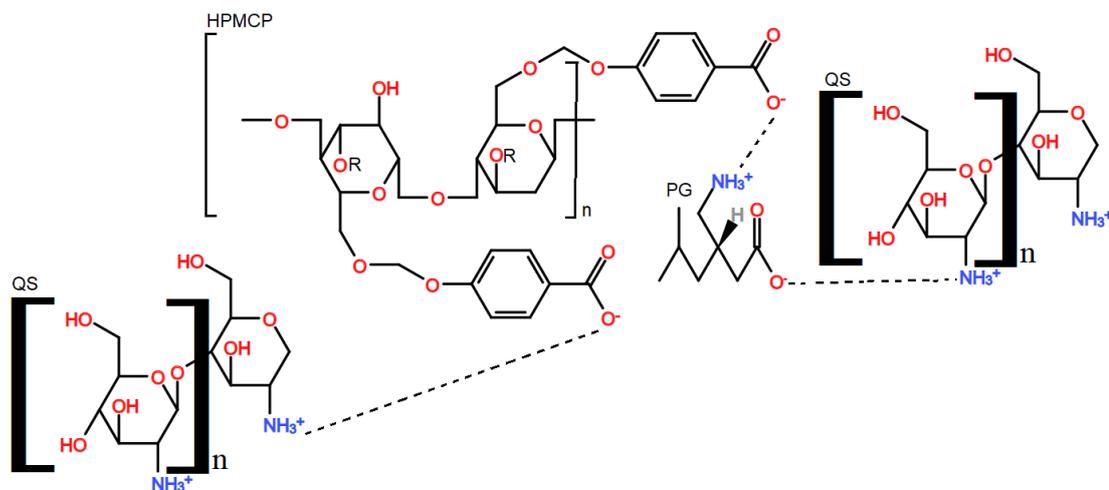


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O espectro da NP PG (FIGURA 11 e TABELA 2) apresentou bandas características aos grupamentos O-H, N-H, NH_2 , C-N, C-O-C, C=O de ácido carboxílico, CH_2 , CH_3 , P=O e P-OH. A banda entre 3697 - 3032 cm^{-1} , referente ao estiramento O-H, sobreposta ao estiramento N-H, apresenta-se deslocada e mais

intensa que os polímeros QS e HPMCP isolados, indicando complexação polimérica da QS com o HPMCP através de ligações de hidrogênio entre o grupamento NH_3^+ e COO^- , respectivamente, e também complexação da PG com os polímeros (FIGURA 13). As ligações de hidrogênio podem, ainda, ser evidenciadas pela banda entre 2642 e 2555 cm^{-1} . Também é possível observar uma banda entre 2970 e 2912 cm^{-1} , referente à vibração de estiramento do grupo CH_3 , mais intensa do que nos polímeros isolados e NP VAZ, indicando que a PG se complexa com os polímeros e muda a conformação da partícula. Ainda, observa-se banda em 1637 cm^{-1} , referente ao dobramento angular de N-H da QS e/ou PG sobreposta à C=O em ressonância com anel aromático do HPMCP, indicando mais uma vez a formação da matriz polimérica, com a participação da PG, somado a isso, ocorre o aparecimento de banda de absorção na região de 1560 cm^{-1} , referente à NH_2 , indicando que, provavelmente, os grupamentos aminas da QS e/ou da PG interagiram com os grupamentos carbonilas do HPMCP e/ou PG e formaram NH_2 , o que é indicativo mais uma vez da formação do complexo polieletrólítico com PG (FIGURA 13). Também foi possível observar banda na região de 1413 cm^{-1} , mais intensa e deslocada dos polímeros isolados, referente à deformação angular do O-H (QS e/ou HPMCP e/ou PG) sobreposta ao grupamento CH_2 , indicando que a conformação dos polímeros isolados foi alterada, deixando o grupamento CH_2 mais exposto, sendo mais um indicativo da interação entre os polímeros com PG. Também é possível observar banda na região de 1130 a 977 cm^{-1} , referente ao grupamento P=O do fosfato sobreposta ao grupamento C-N, e banda em 943 cm^{-1} , referente ao grupamento P-OH do tampão fosfato, sobreposta ao grupamento C=O, indicando que o tampão não atua na complexação polieletrólítica da NP PG.

Figura 13 - Representação da complexação da QS com HPMCP e participação da PG



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

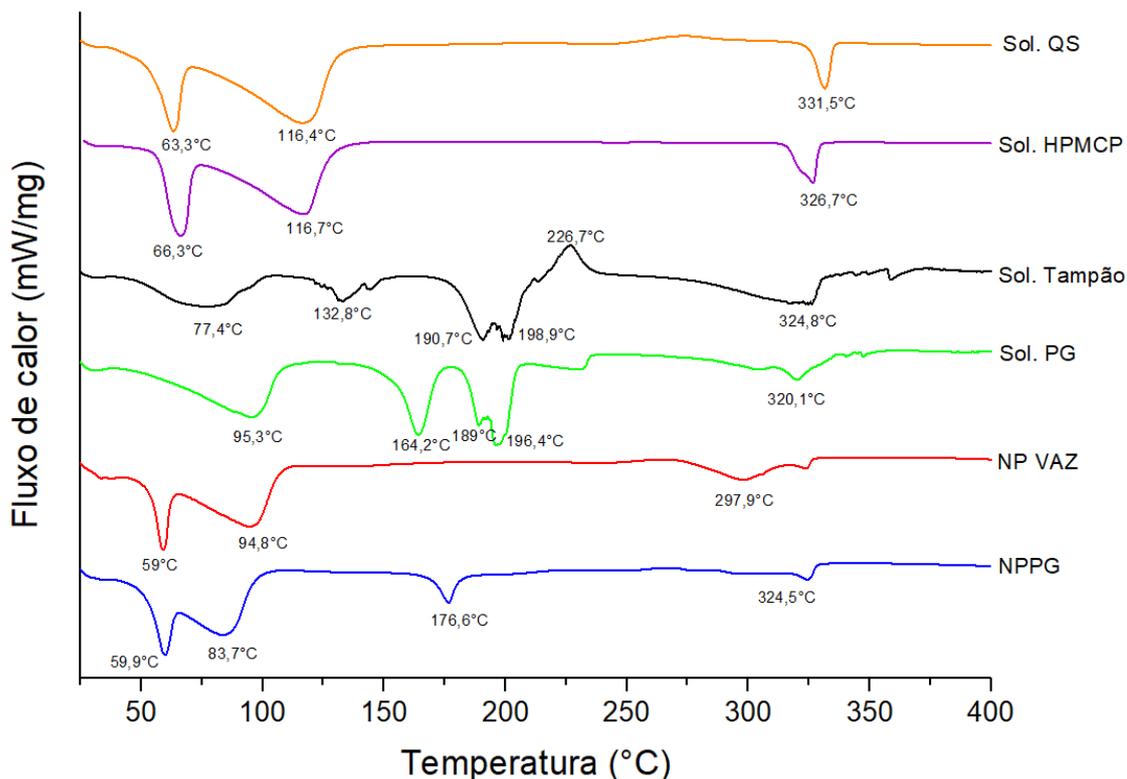
No entanto, pela análise do FTIR da NP PG, não foi possível observar se a PG interagiu totalmente com os polímeros, uma vez que os grupos funcionais da PG são similares aos dos polímeros isolados, não sendo possível a determinação da origem do grupo funcional. Sendo assim, outros testes são necessários para esta confirmação.

6.2.5 Análises térmicas

6.2.5.1 DSC

O teste de calorimetria exploratória diferencial também foi empregado para avaliar a forma de associação entre o fármaco e a nanopartícula, segundo Schaffazick *et al.* (2003). A entalpia das amostras foi normalizada, para que não houvesse interferência de massa em quantidade de calor liberada, já que esses parâmetros são diretamente proporcionais. A Figura 14 mostra os termogramas DSC das NPs e dos seus componentes em solução (liofilizados).

Figura 14 - Curvas de DSC das nanopartículas e componentes da formulação, obtidas sob fluxo de calor de 10°C/min, no intervalo de aquecimento de 25-400°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A solução de quitosana (Sol. QS) apresentou 3 eventos com as seguintes características: o 1º evento é endotérmico com temperatura de pico de 63,3°C e variação de entalpia de -143,2 J/g, provavelmente correspondente à desidratação (água utilizada para o preparo da solução de ácido acético 0,1 M, que foi utilizada para solubilizar a quitosana); o 2º evento é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 116,4°C e variação de entalpia de -454,6 J/g, provavelmente correspondente à fusão da quitosana; o 3º evento também é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 331,5 °C e variação de entalpia de -67,87 J/g, provavelmente correspondente à formação de matriz polimérica (FIGURA 14). Esses valores encontrados estão de acordo com a literatura (HADY *et al.*, 2019; TAKSANDE; UMEKAR, 2018; THAI *et al.*, 2020).

A solução de HPMCP (Sol. HPMCP) apresentou 3 eventos com as seguintes características: 1º evento é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 66,3°C e variação de entalpia de -202,9 J/g, provavelmente correspondente à desidratação

(água utilizada para o preparo da solução de hidróxido de sódio 0,1M, que foi utilizada para solubilizar o HPMCP); o 2° evento é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 116,7°C e variação de entalpia de -496 J/g, provavelmente correspondente ao HPMCP; o 3° evento também é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 326,7°C e variação de entalpia de -101,9 J/g, provavelmente correspondente à formação da matriz polimérica do HPMCP em meio alcalino (FIGURA 14). No entanto, esses resultados são opostos aos encontrados na literatura, que relatam que o HPMCP é amorfo e passa por transição vítrea em 145°C (ALBADARIN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2005). Essa diferença de resultados pode ser explicada pela utilização do HPMCP solubilizado em solução de hidróxido de sódio e liofilizado, no presente estudo, e em sua forma de matéria-prima nos estudos da literatura.

A solução tampão fosfato de sódio 0,2 M pH=6,0 (Sol. Tampão) apresentou 6 eventos, com as seguintes características: o 1° evento é endotérmico e apresentou temperatura de pico de 77,4°C e variação de entalpia de -172,4 J/g, sendo correspondente à ebulição da água. A água foi utilizada para o preparo da solução tampão; o 2° evento é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 132,8°C e variação de entalpia de -71,8 J/g, sendo correspondente provavelmente a transição de fase da amostra; o 3° e o 4° eventos também são endotérmicos e apresentaram temperatura de pico respectivamente de 190,7°C e 198,9°C e variações de entalpia respectivamente de 9,576J/g e -37,19 J/g, correspondentes provavelmente ao tampão fosfato de sódio 0,2 M pH=6,0; o 5° evento é exotérmico e apresenta temperatura de pico de 226,7°C e variação de entalpia de 77,67 J/g, provavelmente correspondente à degradação/oxidação da amostra; o 6° evento é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 324,8°C e variação de entalpia de -172,1 J/g, provavelmente correspondente à formação do sal fosfato de sódio (FIGURA 14).

A solução de PG (Sol. PG) apresentou 5 eventos, com as seguintes características: o primeiro evento endotérmico apresentou temperatura de pico de 95,3°C e variação de entalpia de -265,9 J/g, sendo correspondente com a ebulição da água presente na amostra. A água foi utilizada para o preparo do tampão fosfato de sódio 0,2M pH=6,0, que foi o solubilizante da PG; o 2° evento endotérmico apresentou temperatura de pico de 164,2°C e variação de entalpia de -131,6 J/g, sendo correspondente à fusão da PG, já que a presença do tampão fosfato de sódio

0,2 M pH=6,0 fez com que o pico da fusão da PG fosse deslocado para a esquerda, ficando cerca de 22,8°C menores do que o relatado pela literatura (186°C – 188°C) (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, 2016); o 3° e o 4° eventos endotérmicos apresentaram temperatura de pico de 189,0°C e 196,4°C respectivamente e variação de entalpia de -3,08 J/g e 37,25 J/g respectivamente, sendo correspondentes aos picos de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH=6,0, obtidos pela análise desta substância isolada (FIGURA 14); o 5° evento endotérmico apresentou temperatura de pico de 320,1°C e variação de entalpia de -132,8 J/g e provavelmente é correspondente à formação de um sal entre a PG e o fosfato do tampão, já que sais orgânicos apresentam cargas elétricas de sinais opostos, ocorrendo forte atração eletrostática entre os íons, sendo necessária grande energia para romper esta atração, ocasionando ponto de fusão e de ebulição elevados (SOLOMONS; FRYHLE, 2012).

A nanopartícula vazia (NP VAZ) apresentou 3 eventos endotérmicos com as seguintes características: o 1° evento apresentou temperatura de pico de 59,0°C e variação de entalpia de -74,5 J/g, provavelmente devido à desidratação (água presente na amostra, que foi utilizada para o preparo das soluções de tampão fosfato, ácido acético e hidróxido de sódio para o preparo das nanopartículas); o 2° evento apresenta temperatura de pico de 94,8°C e variação de entalpia de -255,8 J/g, que provavelmente é correspondente ao HPMCP e/ou à QS; o 3° evento apresenta temperatura de pico de 297,9°C e variação de entalpia de -143,4 J/g, provavelmente correspondente à interação polimérica formada (nanocompósito). Outro fator que sugere a interação polimérica é o deslocamento da temperatura dos picos correspondentes às soluções de polímeros isolados, para temperaturas menores, no termograma da NP VAZ (FIGURA 14).

A nanopartícula de PG (NP PG) apresentou 4 eventos, com as seguintes características: o 1° evento é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 59,9°C e variação de entalpia de -51,1 J/g, provavelmente devido à desidratação (água presente na amostra, que foi utilizada para o preparo das soluções de tampão fosfato, ácido acético e hidróxido de sódio para o preparo das nanopartículas); o 2° evento é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 83,7°C e variação de entalpia de -31,6 J/g, que provavelmente é correspondente ao HPMCP e/ou à QS; o 3° evento é endotérmico com temperatura de 176,6°C e pico de e variação de entalpia de -421,6 J/g, correspondente à fusão da PG deslocada em função da

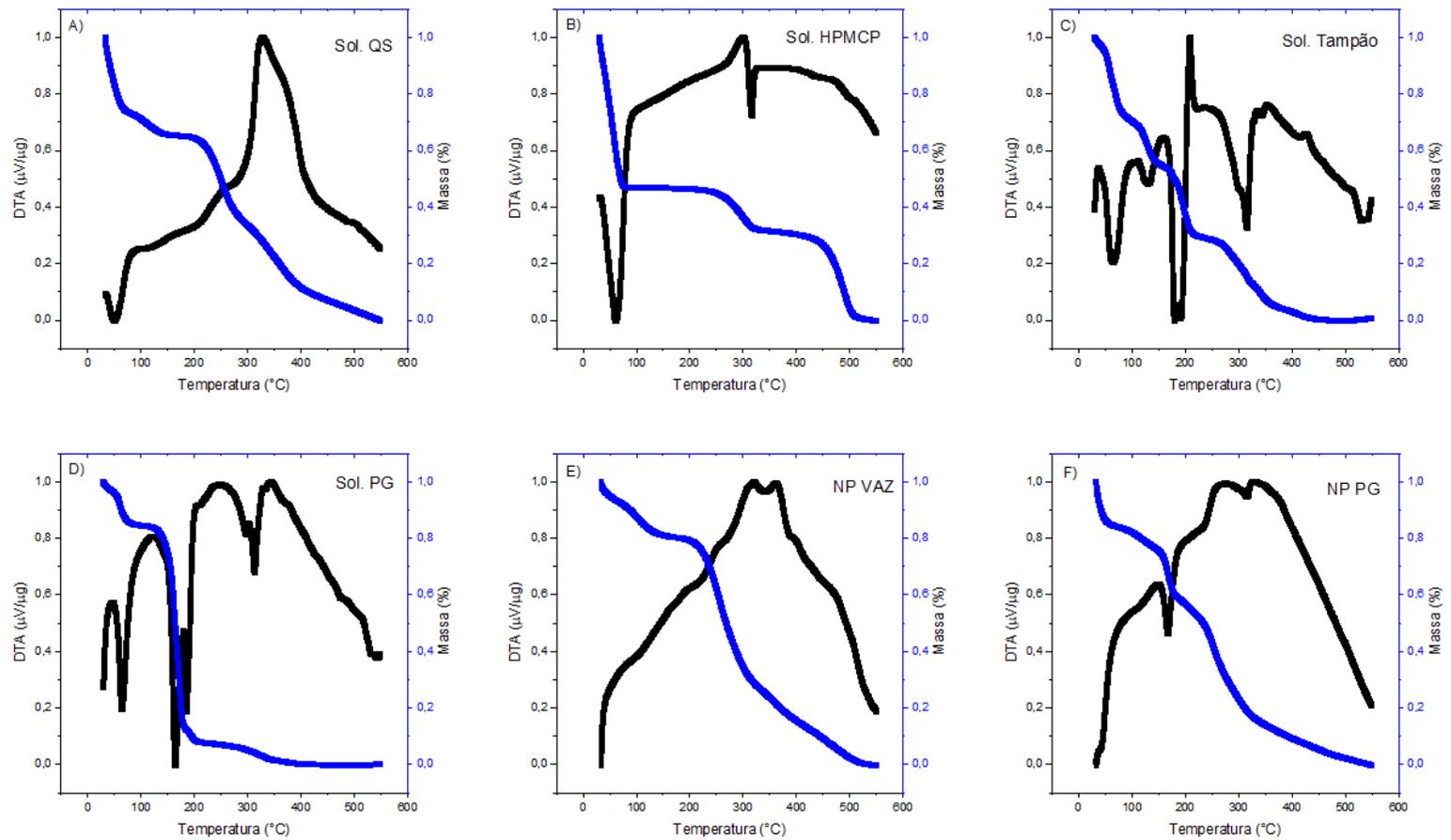
matriz polimérica; o 4º evento também é endotérmico e apresenta temperatura de pico de 324,5°C e variação de entalpia de -14,58 J/g, provavelmente correspondente à interação polimérica formada (nanocompósito) (FIGURA 14). Outro fator que sugere a interação polimérica é o deslocamento dos picos correspondentes às soluções de polímeros isolados para temperaturas menores no termograma da NP PG. Além disso, pelo fato de apresentar pico correspondente à fusão da PG no termograma da NP PG, sugere-se que a PG não foi totalmente incorporada à matriz polimérica ou não interagiu totalmente com os polímeros, já que a ausência de picos correspondentes ao ponto de fusão do fármaco são indicativos que o fármaco encontra-se na forma amorfa e, portanto, molecularmente disperso na matriz polimérica (SIPOS *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2013). Essa sugestão de que a PG pode estar presente fora da matriz polimérica pode estar associado à taxa de associação de 44% (item 6.2.2). Este fato também foi verificado por Ghumman *et al.* (2019), no qual picos endotérmicos próximos à fusão da PG nas microesferas foram observados, indicando que a PG não interagiu com a mucilagem. Já Aydogan *et al.* (2015) e Taksande e Umekar (2018) notaram o desaparecimento de pico endotérmico referente à fusão da PG nas microesferas preparadas, que foi associado à incorporação de PG na matriz polimérica. No entanto, como o potencial zeta não foi estatisticamente diferente entre as NP PG e NP VAZ (item 6.2.1), não foi possível confirmar por estes testes (DSC e potencial zeta) se toda a PG foi incorporada à matriz polimérica. Seriam necessários outros testes, como o teste de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), que não foi possível ser realizado, pois as NPs não se solubilizaram no solvente para a realização das análises.

Em resumo, pelos termogramas de DSC, sugere-se a formação das nanopartículas, tanto da NP VAZ quanto da NP PG, pela presença de um evento em alta temperatura, sugerindo a formação polimérica (SOLOMONS; FRYHLE, 2012) e, pela presença de eventos correspondentes aos polímeros, com picos deslocados. Além disso, a NP PG se diferenciou da NP VAZ pela presença de PG, que também se apresentou deslocado quando comparado com a PG em solução, sugerindo que parte do fármaco está incorporado à matriz polimérica e parte está livre.

6.2.5.2 Termogravimetria (TG)

As análises da estabilidade térmica das NPs foram realizadas de acordo com o item 5.2.6.2. A Figura 15 apresenta o comportamento térmico das NPs e dos seus constituintes liofilizados.

Figura 15 - Curvas TG e DTA de Sol. QS (A), Sol. HPMCP (B), Sol. Tampão (C), Sol. PG (D), NP VAZ (E) e NP PG (F) obtidas em razão do aquecimento de 10°C/min, no intervalo entre 25 a 550°C, sob atmosfera dinâmica de nitrogênio



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

O termograma da solução de quitosana está representada na Figura 15-A, onde pode-se observar a perda inicial de massa de 35%, abaixo de 100°C, referente à desidratação e perda acentuada de massa, a partir de 200°C, referente à degradação da quitosana. Estes eventos de desidratação e degradação também foram observados por Tabaraki e Sadeghinejad (2018). Além disso, os resultados da Figura 15-A são condizentes com os resultados obtidos pela análise de DSC (item 6.2.5.1). Sendo assim, é possível considerar a quitosana como termicamente estável até 200°C.

A Figura 15-B mostra o termograma da solução de HPMCP, onde pode-se observar a perda inicial de massa de 31%, referente à desidratação e perda de 12% no intervalo de 250 a 320°C, referente à degradação do HPMCP, não apresentando perda considerável de massa até 450°C, sugerindo que este polímero é termicamente estável. Esses resultados também estão condizentes com os resultados obtidos pelo teste de DSC (item 6.2.5.1). Um perfil de termodecomposição semelhante foi observado por Naves (2018).

O termograma da solução tampão fosfato de sódio pH=6,0 (FIGURA 15-C) mostra perda de massa de 50% até 200°C e perda dos 50% restantes até 350°C, sugerindo que a degradação do tampão é praticamente contínua, ou seja, não apresenta estabilidade térmica. Os resultados obtidos são condizentes com os resultados de DSC (item 6.2.5.1).

A Figura 15-D mostra o termograma de Sol. PG, onde pode ser observado que não houve perda de massa significativa até 180°C, que é condizente com a temperatura de fusão da PG. A partir desta temperatura, a PG é completamente degradada. Este perfil de termodecomposição da PG após o seu ponto de fusão também foi observado por Ghumman *et al.* (2019). Além disso, os resultados obtidos pelo termograma da Sol. PG são condizentes com os resultados obtidos pelo teste de DSC (item 6.2.5.1). Sendo assim, a PG pode ser considerada termicamente estável até 180°C.

O termograma da nanopartícula vazia (FIGURA 15-E) mostra perda inicial de massa de 20%, referente à desidratação e perda brusca de massa a partir de 195°C, sugerindo degradação da matriz polimérica formada, o que corresponde aos resultados de DSC (item 6.2.5.1). A NP VAZ pode ser considerada como formulação termicamente estável.

A Figura 15-F mostra o termograma da nanopartícula de PG, onde pode ser observada perda inicial de massa de 25%, referente à desidratação, pode-se observar também que ocorre perda de massa de 15% entre 150°C e 175°C, referente à degradação da PG que não interagiu com a matriz polimérica, condizente com a taxa de incorporação (item 6.2.2), além de perda significativa de massa a partir de 200°C, sugerindo degradação da matriz polimérica formada, que também pode ser observado nos resultados de DSC (item 6.2.5.1). A formulação NP PG pode ser considerada como termicamente estável.

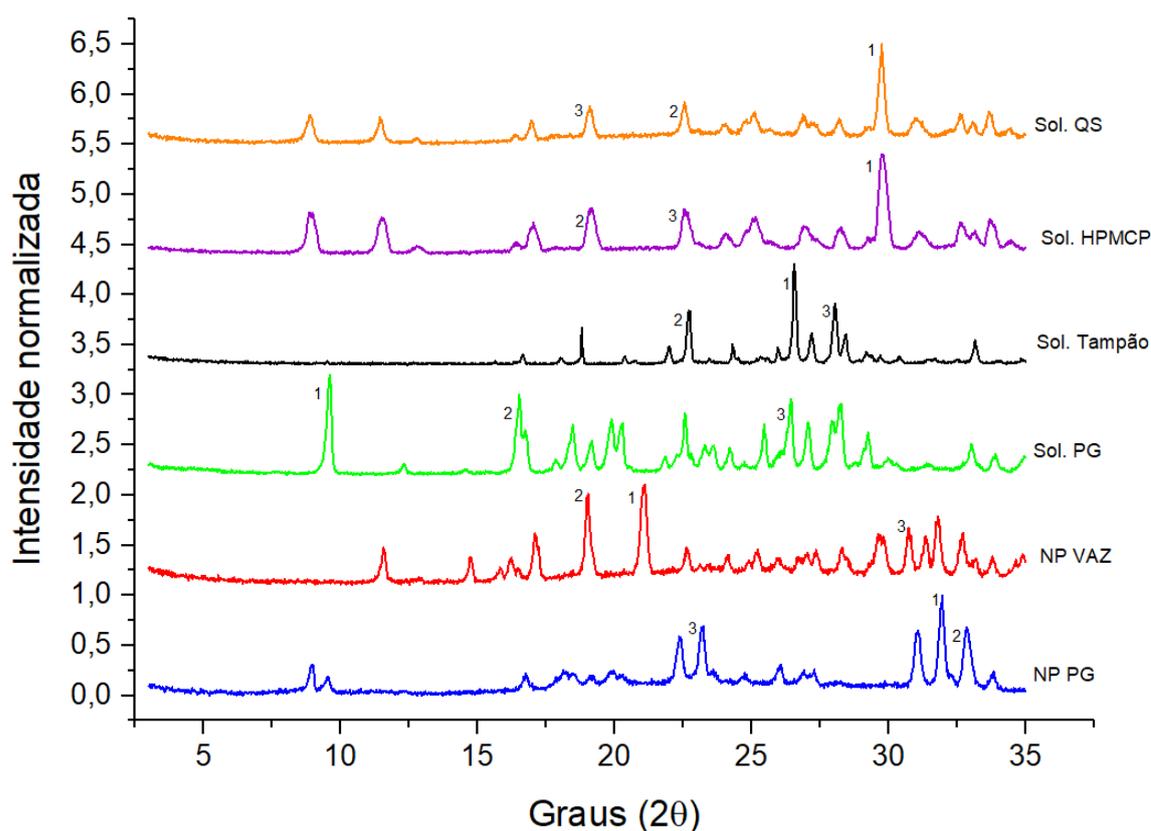
Em resumo, pela análise dos termogramas, também foi possível sugerir a formação de nanopartículas, devido à presença de eventos exotérmicos em altas temperaturas, tanto na NP VAZ quanto na NP PG, além de sugerir que a PG não interagiu completamente com a matriz polimérica na NP PG, devido à presença de um evento endotérmico na região próxima ao ponto de fusão do fármaco. Ainda, foi possível sugerir que as formulações desenvolvidas são termicamente estáveis, pois a maior perda de massa ocorre em altas temperaturas e, que as NPs são mais estáveis que os polímeros isolados; já que foi possível observar o deslocamento do pico de evaporação de compostos voláteis para temperaturas maiores (de 66°C nos polímeros separados - para 147°C (NPs)). Esse perfil de deslocamento do pico, correspondente à degradação de substâncias voláteis para temperaturas maiores, também foi observado por Naves (2018).

A avaliação do perfil de termodecomposição das NPs foi útil para permitir a escolha da temperatura de secagem para o teste de taxa de associação da PG à NP (item 5.2.3) e para a secagem do plasma para os testes farmacocinéticos (item 9.4).

6.2.6 Difração de raios-X

É importante analisar o estado de cristalinidade do fármaco dentro de uma matriz polimérica, pois esta propriedade pode influenciar na solubilidade e, conseqüentemente, na biodisponibilidade da formulação, segundo Yadav *et al.* (2008). As amostras liofilizadas foram analisadas conforme o item 6.2.6.1. Os difratogramas estão representados na Figura 16.

Figura 16 - Difratogramas de raios X das NPs e dos seus constituintes liofilizados



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

A Sol. QS apresentou picos de cristalinidade, sendo os mais intensos em 29,76° (1), 22,56° (2) e 19,1° (3) 2θ. É importante ressaltar que os picos característicos da QS (10° e 20° 2θ), que são referentes aos cristais anidros de QS, de acordo com Bhumkar e Pokharkar (2006), estão presentes no difratograma do presente estudo. Os outros picos de cristalinidade presentes no difratograma da

Figura 16 possivelmente são referentes à estrutura formada entre a QS e o seu diluente (ácido acético 0,1 M pH=5,5).

A Sol. HPMCP apresentou picos de cristalinidade, sendo os mais intensos em $29,76^\circ$ (1), $22,54^\circ$ (2) e $19,12^\circ$ (3) 2θ . Provavelmente, esses picos são correspondentes à estrutura formada entre o HPMCP e o seu diluente (hidróxido de sódio 0,1M pH=5,5), já que Wang *et al.* (2005) relata que o HPMCP é um polímero amorfo. Além disso, foi possível observar que a Sol. de QS e a Sol. de HPMCP se cristalizam de forma semelhante, pela correspondência dos picos no difratograma.

A Sol. tampão liofilizada apresentou picos de cristalinidade, sendo os mais intensos em $26,56^\circ$ (1), $28,08^\circ$ (2) e $26,56^\circ$ (3) 2θ .

A Sol. PG apresentou picos de cristalinidade correspondentes com a PG depositados no The Cambridge Structural Database (CSD, 2018) e com a Sol. tampão, já que foi preparada nesse diluente. Os picos mais intensos ocorreram em $9,58^\circ$ (1), $16,52^\circ$ (2) e $26,44^\circ$ (3) 2θ .

A NP VAZ apresentou picos de cristalinidade, sendo os mais intensos em $21,06^\circ$ (1), $19,04^\circ$ (2) e $31,8^\circ$ (3) 2θ . Foi possível observar pelo difratograma, que a NP VAZ apresenta forma cristalina, diferente dos polímeros de origem, indicando que, pela complexação dos polímeros, houve formação de nova estrutura cristalina, segundo Pedreiro (2015). Além disso, como a forma cristalina da NP VAZ é diferente da forma cristalina da NP PG, indica que a presença do fármaco altera a forma cristalina da NP, possivelmente pela interação com os polímeros da matriz.

A NP PG apresentou picos de cristalinidade, sendo os mais intensos em $31,96^\circ$ (1), $23,2^\circ$ (2) e $32,84^\circ$ (3) 2θ . Foi possível observar pelo difratograma, que a NP PG apresenta forma cristalina diferente dos polímeros de origem e do fármaco, indicando que pela complexação dos polímeros houve a formação de nova estrutura cristalina, de acordo com Pedreiro (2015). Além disso, os picos correspondentes à PG estão presentes, porém deslocados, indicando interação entre o fármaco e os polímeros, e ainda que o fármaco não foi totalmente incorporado à matriz polimérica, já que a presença de picos referentes ao fármaco é indicativa de que há fármaco na sua forma cristalina na formulação (GHUMMAN *et al.*, 2019). A presença de PG fora da matriz polimérica pode ser corroborada também pelos itens 6.2.2; 6.2.5.1 e 6.2.5.2.

6.2.7 Estabilidade

O teste de estabilidade foi feito de acordo com o item 5.2.8. Os resultados do são mostrados nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Avaliação do tamanho, polidispersão e do potencial zeta das amostras de NP PG e NP VAZ recém preparadas

Amostra	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
NP PG	435	0,215	+17,9
NP VAZ	436	0,244	+18,1

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: NP PG: nanopartícula polimérica contendo pregabalina; NP VAZ: nanopartícula sem pregabalina; PDI: índice de polidispersividade.

Tabela 4 - Avaliação do tamanho, polidispersão e do potencial zeta das amostras de NP PG e NP VAZ após 30 dias do preparo, em meio aquoso, armazenadas em temperatura de 25°C, sem contato com a luz e com a atmosfera

Amostra	Tamanho (nm)	PDI	Potencial zeta (mV)
NP PG	411 ^{***}	0,156 ^{***}	+18,2 [*]
NP VAZ	865 ^{°°°}	0,216 ^{°°°}	+18,0

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: NP PG: nanopartícula polimérica contendo pregabalina; NP VAZ: nanopartícula sem pregabalina; PDI: índice de polidispersividade. Teste t de Student: ^{***} $p < 0,0001$; ^{*} $p < 0,05$ quando se comparou NP PG recém preparada com NP PG após 30 dias. ^{°°°} $p < 0,0001$, quando se comparou NP VAZ recém-preparada com NP VAZ após 30 dias

Após 30 dias do preparo, foi possível observar que o tamanho e o PDI da NP PG reduziram significativamente ($p < 0,0001$ para ambos os parâmetros), quando comparada à amostra recém-preparada. Além disso, o potencial zeta aumentou significativamente ($p < 0,05$), quando comparada à amostra recém-preparada. No entanto, o tamanho da NP VAZ após 30 dias aumentou quase 2 vezes ($p < 0,0001$), quando comparada à amostra recém-preparada, o PDI reduziu significativamente ($p < 0,0001$) e o potencial zeta não se alterou ($p > 0,05$). O grande aumento no tamanho da amostra NP VAZ comparada à NP PG, após 30 dias do preparo,

permite inferir que o fármaco contribui para a estabilidade do tamanho da partícula. Por estes resultados é possível concluir que as NPs não são estáveis em meio aquoso, o que era esperado, já que os polímeros vão se hidratando, ao ficar em contato com a água, e ocasionam o relaxamento das cadeias poliméricas, fazendo com que as partículas alterem o seu tamanho, quando estão armazenadas em meio aquoso (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

Entretanto, mesmo não sendo estável em meio aquoso, foi possível observar que a modificação de tamanho não foi observada nos testes NTA e morfologia, realizadas 30 dias após o preparo e mantidas em meios aquosos. Além disso, essa falta de estabilidade em meio aquoso não influencia no presente estudo, pois, em todos os experimentos que as NPs foram administradas em meio aquoso, imediatamente após o seu preparo.

6.3 LIBERAÇÃO *IN VITRO*

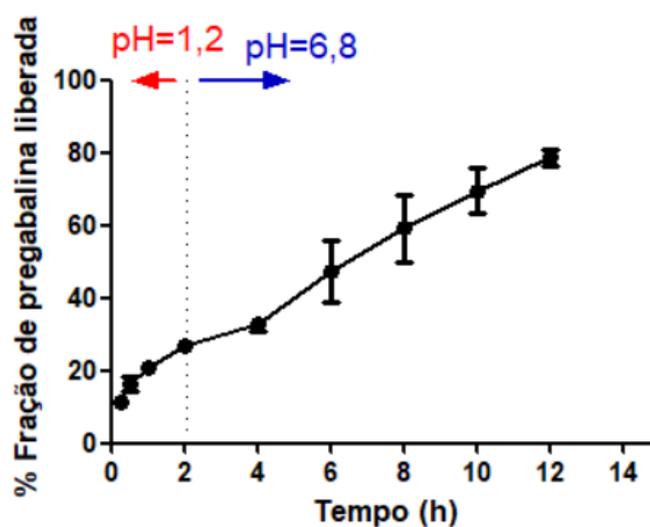
A pregabalina de liberação imediata (Lyrica IR) é rápida e extensivamente absorvida após a administração oral, atingindo a concentração plasmática máxima dentro de 1 h após a administração da respectiva dose de jejum e a PG é absorvida nas partes superiores do trato gastrointestinal, principalmente no duodeno (BEN-MENACHEM, 2004, CHEW *et al.*, 2014). Além disso, o teste de dissolução recomendado pela Farmacopeia Indiana, para cápsulas de PG indica que o tempo total de teste em meio ácido é de 30 minutos, indicando que esta formulação exibe liberação rápida (THE INDIAN PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2010). Portanto, assumimos que a PG em solução também tem um perfil de liberação rápida *in vitro*.

O estudo de liberação da NP PG foi realizado para avaliação do perfil de liberação nos diferentes meios, simulando o meio gástrico (pH 1,2) e o meio entérico (pH 6,8). A NP PG apresentou perfil de liberação multifásico, liberando por volta de 27% de PG em 2 horas (meio gástrico). Em seguida, ocorre a segunda fase de liberação (de 2 a 12 h em meio entérico), atingindo cerca de 78% de liberação após 12 horas (FIGURA 17).

Ainda que a liberação de PG em meio ácido tenha sido baixa, essa liberação descaracteriza uma forma farmacêutica com propriedades gastrorresistentes, conforme Barbosa *et al.* (2019). No entanto, mesmo que a liberação de NP PG seja

multifásica, obtivemos um sistema de liberação modificada e mais lenta de PG. Esse mecanismo multifásico de liberação pode estar associado à interação entre os polímeros e a PG (item 6.2.4), fazendo com que a PG fique mais presa ou mais solta na malha polimérica. Este perfil de liberação lenta obtido é importante para contribuir para a redução dos efeitos colaterais e prolongamento do efeito antinociceptivo da NP PG.

Figura 17 - Percentual de massa acumulada de PG liberada da nanopartícula ao longo do tempo



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

7 CONCLUSÕES PARCIAIS

- a) O método de complexação polieletrólítica, utilizando QS e HPMCP, para o preparo de formulação nanoestruturada contendo PG, permitiu a obtenção de NP PG com tamanho inferior a 500 nm, boa homogeneidade de tamanho de partículas (PDI=0,238), com potencial zeta de +19 mV e com pH adequado para a administração por via oral (pH= 5,7);
- b) Por ser um método de simples execução, utilizando matérias primas baratas, possibilita que a forma farmacêutica final contendo nanopartículas poliméricas com pregabalina seja mais barata do que o comprimido de liberação controlada de pregabalina disponível comercialmente;
- c) O método analítico desenvolvido por HPLC-UV, utilizando coluna de fase reversa e fase móvel isocrática, para a determinação de PG na formulação atende todos os parâmetros de aceitação da RDC 27/2012, por apresentar-se linear, preciso e exato;
- d) A formulação apresentou taxa de associação de PG de cerca de 44%, em decorrência da proporção de fármaco estar maior do que a proporção de polímeros na formulação, já que se sabe que a proporção dos componentes influencia diretamente na taxa de associação;
- e) As partículas apresentaram morfologia esférica, favoráveis para absorção quando administradas por via oral;
- f) Na avaliação do perfil de liberação da formulação desenvolvida, a utilização de meio ácido seguida por meio neutro, mimetizaram bem o efeito prolongado da NP PG administrado por via oral. Nessas condições, ocorreu liberação de 78% de PG em 12 horas. Portanto, este sistema apresentou um grande potencial em controlar a liberação do fármaco, podendo ser opção favorável para a redução da frequência de administrações dessa substância.

CAPÍTULO 2 – FARMACOCINÉTICA

8 REFERENCIAL TEÓRICO

8.1 DEFINIÇÃO

Farmacocinética (PK) é definida como o estudo quantitativo da disposição do fármaco no organismo ao longo do tempo. A sua disposição compreende as ações compostas da sua absorção, distribuição, metabolismo e excreção. Esses processos podem contribuir para a toxicidade de uma substância (LEHMAN-McKEEMAN, 2008).

O conhecimento de PK, em modelos experimentais, é essencial para o desenvolvimento de fármacos; permite entender os ensaios de toxicidade; permite explicar algumas variabilidades interespecie relacionadas ao metabolismo de um composto; decidir sobre o regime apropriado de doses; avaliar a predisposição à reações idiossincráticas e formação de metabólitos reativos e antecipar a exposição da substância em humanos; ainda auxilia na determinação da biodisponibilidade de formulações diferentes. Além disso, em estudos clínicos permite a individualização do tratamento para pacientes com doenças crônicas, principalmente digestiva, circulatória e renal (DiPIRO *et al.*, 2005; RANG *et al.*, 2007).

Quando uma nova forma farmacêutica é proposta, estudos de performance farmacocinética devem ser realizados para definir o efeito das mudanças das características físico-químicas da forma farmacêutica, para avaliar a sua potência, seu limiar de toxicidade e seu uso seguro em humanos (RAVINDRAN *et al.*, 2018).

O efeito farmacológico ou tóxico de uma substância está sempre relacionado com a concentração desta substância no sítio de ação. Geralmente, os sítios receptores dos fármacos estão inacessíveis para estas quantificações ou estão amplamente distribuídos no corpo, fazendo com que medidas diretas não sejam simples ou possíveis de serem realizadas. Entretanto, pode-se quantificar a concentração da substância em fluidos corporais, como sangue, plasma, urina, saliva e outros fluídos facilmente amostráveis. Isso é possível pela propriedade da homogeneidade cinética, que descreve uma relação preditiva entre a concentração

plasmática do fármaco e a concentração desse fármaco no sítio receptor, de forma que se espera que alterações que ocorram na concentração plasmática reflitam alterações proporcionais das concentrações do fármaco nos outros tecidos. Entretanto, as concentrações plasmáticas e nos tecidos não são numericamente iguais, mas apresentam boa aproximação entre elas, e são diretamente proporcionais às propriedades do fármaco e perfusão dos tecidos (DiPIRO *et al.*, 2005; RANG *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2008).

9 MÉTODOS

9.1 ANIMAIS

Foram utilizados 30 ratos machos, raça Wistar, pesando entre 220-250 g, obtidos no biotério da Universidade Federal de Alfenas, com aprovação pelo Comitê de Ética Animal local (Protocolo nº57/2016) (ANEXO A). Todos os animais foram submetidos às mesmas condições ficando em caixas de polipropileno, com o máximo de cinco animais por caixa, mantidos em sala com temperatura ($23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas (70%) e ciclo claro-escuro a cada 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração e água. Além disso, tiveram período de ambientação por 7 a 10 dias, antes de qualquer procedimento. As colheitas de sangue foram iniciadas no período claro do ciclo circadiano. Quando as colheitas eram feitas no período escuro, utilizou-se lâmpada vermelha de 15 Watts (W) para iluminação do ambiente.

9.2 MEDICAMENTOS E SUBSTÂNCIAS

Todas as substâncias foram preparadas ou diluídas imediatamente antes da administração. O volume administrado foi calculado com base no peso de cada animal.

a) PREGABALINA (PG)

- Pregabalina, Musgo Farmácia de Manipulação, Brasil.

- 10 mg/kg, via oral (V.O.), dose única, em água ultrapura (RODRIGUES, 2016)

A dose de PG foi escolhida com base em estudos prévios da autora (RODRIGUES, 2016). A dose escolhida já apresenta efeito antinociceptivo e é possível a quantificação do fármaco.

b) NANOPARTÍCULA POLIMÉRICA COM PREGABALINA (NP PG)

- 10 mg de PG/kg, V.O., dose única (em NP preparada conforme o item 5.1.2, no dia da administração)

- a) **ÁGUA ULTRAPURA**
- Veículo da PG, V.O., dose única - volume correspondente ao administrado de PG em solução
 - Foi escolhida a utilização de água ultrapura para mimetizar a administração em seres humanos.
- b) **NANOPARTÍCULA VAZIA (NP VAZ)**
- Veículo da NP PG (nanopartícula sem PG, preparada conforme o item 5.1.2, no dia da administração), V.O., dose única – volume correspondente ao administrado de NP PG.
- c) **CETAMINA**
- Cloridrato de cetamina 10% injetável, Linavet, Brasil.
 - 90 mg/Kg, intraperitoneal (I.P.) (CENTRO DE BIOTERISMO DA UNIFAL-MG, 2018).
- d) **XILAZINA**
- Xilazina injetável, Hertape Calier Saúde Animal S.A, Brasil.
 - 10 mg/Kg, I.P. (CENTRO DE BIOTERISMO DA UNIFAL-MG, 2018).
- e) **HEPARINA**
- Heparina sódica injetável, Blau Farmacêutica S.A., Brasil.
 - 2% em solução de salina estéril.
- f) **ISOFLURANO**
- Isoflurano, Cristália, Brasil.
 - 8%, inalatório - para a eutanásia do animal (CENTRO DE BIOTERISMO DA UNIFAL-MG, 2018).

9.3 TESTES FARMACOCINÉTICOS *IN VIVO* DA NANOPARTÍCULA DE PG

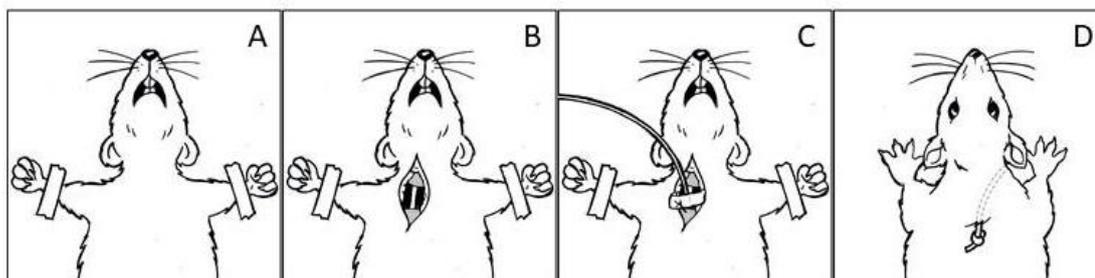
O procedimento de canulação da veia jugular direita externa foi proposto inicialmente por Harms e Ojeda (1974), para que várias colheitas sanguíneas (no

máximo 8 por animal) fossem realizadas para a avaliação dos perfis farmacocinéticos da PG livre e PG nanoencapsulada.

As cânulas foram preparadas previamente ao procedimento, conforme descrito anteriormente (RODRIGUES, 2016).

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina, em seguida tiveram as patas dianteiras presas à bancada, em decúbito dorsal (FIGURA 18 A). Usando a clavícula direita como guia, foi realizada uma incisão cirúrgica e a veia jugular direita foi dissecada (FIGURA 18 B). A cânula, foi então inserida na luz da veia jugular e a alça de parafilme foi fixada no músculo peitoral, para evitar que a cânula fosse removida do local (FIGURA 18 C). Em seguida, a cânula foi passada subcutaneamente até o topo da cabeça do animal, para evitar que o animal estragasse a cânula (FIGURA 18 D). A incisão cirúrgica foi suturada com 4 pontos simples. A cânula foi limpa com solução de heparina e a sua ponta externa foi fechada com um nó simples, até o momento da coleta. O animal foi colocado em caixa separada, para evitar que outros animais removessem a cânula.

Figura 18 - Representação esquemática da canulação da veia jugular direita



Fonte: Aquino Júnior (2019).

Legenda: A) fixação do animal em decúbito dorsal; B) Incisão cirúrgica e dissecação da veia jugular; C) cânula na luz da veia e fixação da cânula no músculo peitoral; D) transpasse da cânula até o dorso do animal.

Após a canulação, 12 horas se passaram até que a administração das substâncias e as colheitas de sangue fossem realizadas.

Para isso, os animais foram aleatoriamente divididos em 2 grupos (n=12 por grupo): NP PG e PG e receberam as substâncias recém-preparadas por via oral (gavagem). Após a administração, foram realizadas colheitas de sangue (500 μ L), nos tempos 10; 30 minutos, 1; 1,5; 2,5; 4; 6; 8; 12; 24; 36 e 48 h. Foi realizada reposição de volume com solução fisiológica após cada colheita; após a última

colheita, os animais foram eutanasiados por excesso de anestésico (isoflurano). A morte foi confirmada pela ausência dos sinais vitais e coloração das mucosas.

Após a colheita, em tubos heparinizados, o plasma foi separado por centrifugação e armazenado a -80°C até o momento da análise.

9.3.1 Método cromatográfico de análise de PG em plasma de rato

O método desenvolvido consistiu em confecções de curvas analíticas utilizando metformina (500 ng/mL em acetonitrila) como padrão interno e padrão secundário de PG (em metanol), em seis concentrações crescentes entre 0,4-50 $\mu\text{g/mL}$, que quando adicionadas a 100 μL de plasma branco (animais que não receberam a PG) correspondendo a 0,1- 12,5 $\mu\text{g/mL}$ de plasma.

As amostras foram preparadas através da precipitação de proteínas com acetonitrila (1:10 %v/v de plasma: acetonitrila), seguida por centrifugação em alta rotação (17800 g por 10 minutos). Após a centrifugação, 900 μL do sobrenadante foi retirado e seco sob vácuo a 80°C . O resíduo foi ressuscitado em 200 μL de fase móvel (proporção inicial do gradiente) e 50 μL foram submetidos a análise cromatográfica (cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas).

Utilizou-se como fase móvel acetonitrila: solução de formiato de amônio 2 mM pH 3,0, em fluxo gradiente (condição inicial 70:30 % v/v, mantida até 7 minutos, seguida por redução linear da proporção da fase orgânica durante 1 minuto até 50:50 %v/v, que foi mantida por 5 minutos, para limpeza da coluna, seguida pelo retorno linear das condições iniciais, durante 1 minuto e estabilização da coluna na condição inicial por 5 minutos), com fluxo constante de 0,2 mL/min. O pH da solução de formiato de amônio foi ajustado utilizando-se ácido fórmico. Como fase estacionária utilizou-se coluna BEH HILIC ACQUITY UPLC (2,1mm x 50 mm x 1,7 μm), com forno a 50°C , detector UV com $\lambda=190$ nm, com tempo de análise cromatográfica de 19 minutos.

A análise foi realizada com fonte ESI, em ionização no modo positivo, com monitorização das seguintes transições de massa: 159,85 > 142,10; 159,85 > 97,20 e 159,85 > 83,20 para PG e 130,10 > 60,05; 130,10 > 71,05 e 130,10 > 68,00 para a metformina (padrão interno). As condições do espectrômetro de massas foram:

fluxo do gás nebulizador = 1,5 L/min; temperatura da DL = 250°C; temperatura do bloco aquecedor = 400°C; fluxo do gás de secagem = 15 L/min.

O método de análise desenvolvido para PG foi validado de acordo com a RDC nº27/2012 (BRASIL, 2012a) (APÊNDICE C).

9.4 ANÁLISE FARMACOCINÉTICA

As concentrações plasmáticas obtidas experimentalmente das colheitas seriadas de sangue, após quantificação segundo item 9.3.1 foram utilizadas para cálculo dos parâmetros farmacocinéticos. Foram calculados: biodisponibilidade (representada pela área sob a curva - AUC, do inglês *Area Under the Curve*); distribuição (representada pelo volume de distribuição - Vd) e eliminação (representada pela meia-vida - $t_{1/2}$ e *Clearance*), de acordo com DiPiro *et al.* (2005).

A curva foi construída através da concentração plasmática *versus* tempo ($AUC^{0-\infty}$) e foi calculada através do método dos trapezoides, conforme Boroujerdi (2002). A análise farmacocinética foi realizada utilizando-se o add-in PKSolver, no Microsoft Excel® (ZHANG *et al.*, 2010). Para avaliação estatística dos parâmetros farmacocinéticos, foi aplicado o teste de Mann-Whitney bicaudado, para avaliação de diferenças entre os grupos, com intervalo de confiança de 95% e nível de significância fixado em 5%.

10 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na Tabela 5 estão expressos os valores calculados para os parâmetros farmacocinéticos avaliados para PG (PG) e nanopartícula de PG (NP PG).

Tabela 5 - Parâmetros farmacocinéticos estimados após administração oral de PG e nanopartícula de PG (10 mg/Kg) em ratos (n= 6, para cada perfil). Dados expressos como mediana, IC=95%

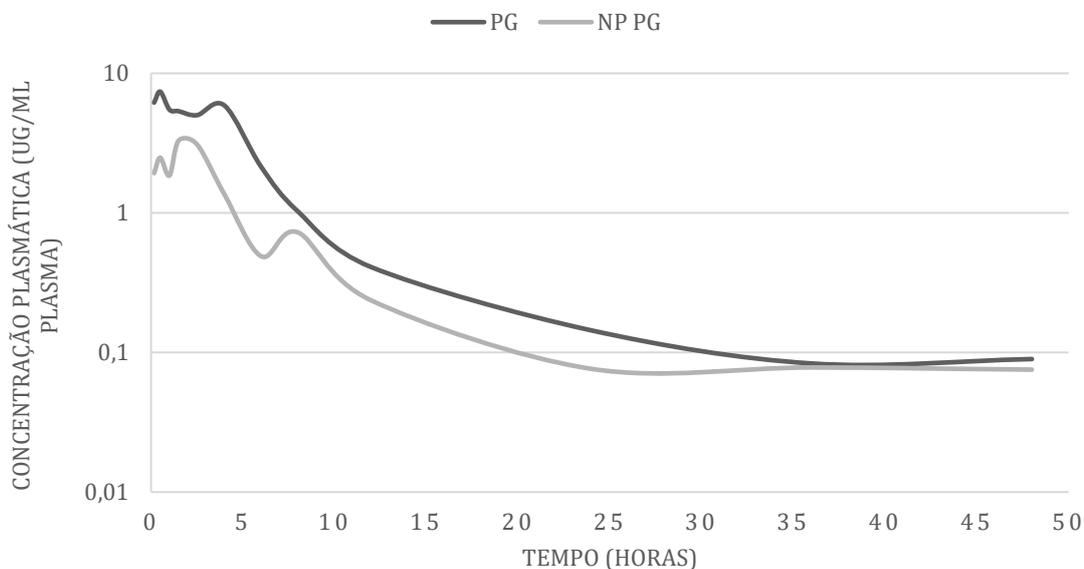
Parâmetro	PG	NP PG
AUC ($^{0-\infty}$) ($\mu\text{g/mL}\cdot\text{h}$)	39,60 (82,55-24,25)	22,08 * (32,16-13,53)
Cmax ($\mu\text{g/mL}$)	6,56 (5,06-13,88)	3,48 ** (5,70-1,40)
Tmax (h)	0,75 (0,5-4)	1,5 (0,5-2,5)
Vd (L/Kg)	2,51 (1,82-6,44)	8,21 * (98,02-3,33)
t _{1/2} (h)	7,03 (6,68-10,83)	10,01 (178,35-7,42)
Cl (L/Kg/h)	0,25 (0,12-0,41)	0,46 * (0,31-0,74)

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: Teste de Mann-Whitney bicaudado. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Os perfis farmacocinéticos médios (n=6, para cada perfil), utilizando modelo não compartimental, estão representados na Figura 19.

Figura 19 - Perfil farmacocinético médio após administração oral de PG e nanopartícula de PG (10 mg/Kg) em ratos (n= 6, para cada perfil) administrada em dose única em ratos.



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Pela Tabela 5 e pela Figura 19 foi possível observar que a biodisponibilidade e a concentração plasmática máxima da PG foram significativamente maiores do que na NP PG ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente). Esse fato pode ser associado à não-liberação completa da PG da matriz polimérica, já que no item 6.3, após 12 horas de liberação *in vitro*, 78,63% de PG tinha sido liberada. Essa redução da biodisponibilidade e da concentração plasmática máxima também foram observadas no estudo realizado por Chew *et al.* (2014), utilizando comprimidos revestidos para liberação controlada de PG (Lyrica CR[®]), quando a administração foi feita em jejum. A redução foi observada também por Kim *et al.* (2020), utilizando comprimidos triplamente revestidos, administrados em jejum ou após alimentação em beagles ou humanos. Também foi observada essa redução com a administração de comprimidos gastro-flutuantes de PG para cães em jejum (QIN *et al.*, 2018). No entanto, Ghumman *et al.* (2019) observaram aumento da biodisponibilidade e da concentração plasmática máxima, quando administraram microesferas de mucilagem de inhame e alginato contendo PG. Kim *et al.* (2018) também observaram um aumento de AUC e C_{max} em uma das suas formulações, desenvolvidas para comprimidos gastrorretentivos não-efervescente contendo PG.

Além disso, o T_{max} da NP PG foi 2 vezes maior do que na PG, indicando que a nanopartícula desempenhou um papel de liberação controlada de PG. Esse aumento do T_{max} também foi observado por outros autores, que propuseram outras formas farmacêuticas de liberação modificada de PG (GHUMMAN *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2018).

Ainda, foi possível observar que o volume de distribuição e o *clearance* foram significativamente maiores na NP PG do que na PG ($p < 0,05$ em ambos os parâmetros) indicando que a NP PG permitiu maior distribuição da PG pelo organismo, o que indica a saída fármaco do sangue, e depósito em tecidos e órgãos, modificando o V_d (MATHA *et al.*, 2020). É natural que, com o aumento do volume de distribuição, ocorra aumento no *clearance*, já que esses dois parâmetros têm relação proporcional. Além disso, o aumento do *clearance* impacta na redução da biodisponibilidade (DiPIRO *et al.*, 2005). No entanto, nenhum dos autores que propuseram formas farmacêuticas de liberação modificada para PG, relataram os valores de V_d e Cl calculados.

A meia-vida de eliminação da NP PG teve aumento de 3 horas em relação à PG, indicando que a eliminação foi mais lenta no caso da nanopartícula. Outras formas farmacêuticas de liberação controlada de PG também apresentaram $t_{1/2}$ maior do que a forma de liberação imediata (GHUMMAN *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2018; KIM *et al.*, 2020; QIN *et al.*, 2018).

Os parâmetros de volume de distribuição e *clearance*, juntamente com a $t_{1/2}$, são os parâmetros utilizados para a determinação dos regimes de dosagens (DiPIRO *et al.*, 2005). Um equilíbrio entre esses parâmetros é necessário para evitar efeitos colaterais e acúmulo (MATHA *et al.*, 2020).

Ainda, foi possível observar pela Figura 19 que a liberação da PG da NP ocorreu em 2 estágios. O primeiro com pico máximo em 1 hora e o segundo com pico máximo em 8 horas. O primeiro estágio relaciona-se com a liberação imediata de PG que não estava na matriz polimérica, já que a taxa de associação da PG (item 6.2.2) foi de 44%. O segundo estágio é referente à liberação da PG da matriz polimérica.

11 ONCLUSÃO PARCIAL

- a) O método desenvolvido por UPLC-MS/MS e validado de acordo com a RDC 27/2012, para análise de pregabalina em plasma, empregando coluna de interação hidrofílica com fase móvel em gradiente, apresentou-se linear, seletivo, preciso e exato, além de possibilitar um baixo volume de plasma (100 μ L) e um preparo de amostra simples e rápido;
- b) O método de análise da PG permitiu analisar todas as amostras de plasma coletadas até 48 h após a administração de dose única de NP PG ou PG (ambas na dose de 10 mg/Kg) em ratos machos;
- c) A NP PG apresentou menor biodisponibilidade e menor concentração plasmática máxima do que a PG em solução, provavelmente em decorrência das características da formulação desenvolvida. Ainda, a NP PG apresentou maior distribuição no organismo, sugerindo um perfil farmacocinético de circulação estendida. Além disso, a NP PG também apresentou um maior *clearance* do que PG em solução. Os valores elevados desse parâmetro são decorrentes do aumento do volume de distribuição e o *clearance* aumentado impacta na redução da biodisponibilidade.

CAPÍTULO 3 – AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DA NP PG

12 REFERENCIAL TEÓRICO

12.1 DEFINIÇÃO E EPIDEMIOLOGIA DA DOR

De acordo com a IASP e tradução oficial da SBED, a dor é “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada, ou semelhante àquela associada, a uma lesão tecidual real ou potencial” (IASP, 2020; SBED, 2020).

A dor pode ser classificada temporalmente em aguda e crônica. A dor aguda é uma dor recente e de curta duração, induzindo sensação desagradável ao estimular a via nociceptiva, com objetivo de alertar o organismo contra alguma ameaça a sua integridade. Já a dor crônica se caracteriza por induzir alterações e adaptações que gerem e mantenham padrões de dor de longa duração, afetando negativamente a qualidade de vida das pessoas, e não traz mais nenhum benefício ao organismo (BESSON, 1999; GEREAU *et al.*, 2014; GOLD; GEBHART, 2010; IASP, 2020; NATHAN, 1977; PIMENTA *et al.*, 2001).

A dor também pode ser classificada de acordo com o seu mecanismo fisiopatológico em: dor nociceptiva, dor inflamatória, dor neuropática, dor mista e dor disfuncional (nociplástica). A dor nociceptiva ocorre pela ativação fisiológica e direta dos nociceptores, através de agentes físicos, químicos, biológicos e elétricos. A dor inflamatória é caracterizada pela ação de mediadores inflamatórios no sítio da lesão causada por trauma ou agentes infecciosos, podendo ser aguda ou crônica, além de ser responsiva aos agentes anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais. A dor neuropática é uma condição crônica e é definida pela IASP como “dor causada por lesão ou doença do sistema somatossensorial”, ou seja, é a lesão ou disfunção do SNP ou do SNC, sendo melhor compreendida como ativação incomum da via nociceptiva. Geralmente, este tipo de dor não responde adequadamente aos analgésicos comuns. A dor mista se caracteriza por “uma sobreposição complexa dos diferentes tipos de dor conhecidos (nociceptiva, neuropática e nociplástica) em qualquer combinação, atuando simultaneamente para causar dor na mesma área corporal”. Qualquer um dos mecanismos pode ser clinicamente mais predominante em qualquer tempo, tornando-a de difícil tratamento. Este tipo de dor pode ser

aguda ou crônica. Já a dor disfuncional ou nociplástica é “a dor que surge de nocicepção alterada, apesar de não existirem evidências claras de danos reais ou potenciais nos tecidos que desencadeiem a ativação de nociceptores periféricos ou provas de lesão ou doenças no sistema somatossensorial que causem a dor”. Os pacientes podem apresentar dor nociceptiva e dor disfuncional combinadas. O exemplo mais clássico de dor disfuncional é a fibromialgia (BRASIL, 2012b; DAVIS; MOAYEDI, 2013; FREYHNHAGEN *et al.*, 2019; IASP, 2020; SMALLWOOD *et al.*, 2013; YAM *et al.*, 2018;).

Muito pouco se conhece sobre a epidemiologia da dor neuropática devido a problemas práticos de como definir e diagnosticar este tipo de dor. Ainda assim, estima-se que a prevalência mundial de dor crônica seja de até 10%, de acordo com Scholz *et al.* (2019) e que a prevalência de dor neuropática mundial ocorra em torno de 3 a 17%, conforme Cavalli *et al.* (2019). De acordo com Carvalho *et al.* (2018), dos 27 345 dos brasileiros participantes do estudo, 76,17% são acometidos por dor crônica, que é definida por apresentar duração de pelo menos seis meses, que vai de encontro com o achado na meta-análise realizada por Vasconcelos e Araújo (2018) que encontraram que essa patologia acomete em torno de 29,3 a 73,3% da população brasileira, variável de acordo com o tipo de estudo realizado. Segundo Carvalho *et al.* (2018), dos pacientes com dor crônica participantes do estudo, mais de 68% apresentaram algum tipo de dor neuropática. Carvalho *et al.* (2018) atribuem que a alta prevalência de dor crônica no Brasil, comparada com a estimativa global, ocorre principalmente devido à diferença do método utilizado para a coleta de dados, pela diferença dos países investigados e pela diferente definição de dor crônica utilizada para a realização de cada estudo.

Segundo Cohen e Mao (2014), uma razão para a alta taxa de prevalência de dor crônica, particularmente de dor neuropática, é a ausência da efetividade dos tratamentos. Este fato vai de acordo com o relato de Sheahan publicado no site RELIEF sobre um assunto abordado no Congresso Mundial de Dor, organizado pela IASP, em 2018, que diz que historicamente a dor neuropática tem sido difícil de diagnosticar e de tratar porque esta não é uma condição de “tamanho único”, que ocorre da mesma maneira para todos os indivíduos. Além disso, relatou também, que as taxas de falhas de medicamentos prescritos com maior frequência para o tratamento de dor neuropática, atingem cerca de 70% em alguns tipos dessa patologia (SHEAHAN, 2018). Para Zilliox (2017), a maioria dos pacientes com dor

neuropática não está satisfeita com o tratamento, principalmente porque este tipo de dor é frequentemente refratário aos tratamentos disponíveis e apresentam altas taxas de efeitos colaterais.

Apesar das diferenças das estimativas epidemiológicas, o fato mais relevante é que a dor é uma das razões mais frequentes que ocasionam incapacidade e sofrimento aos pacientes, alta incidência de busca por atendimento médico e afastamento do trabalho. Em adição, é importante reconhecer que a dor neuropática afeta muitos aspectos da vida diária dos pacientes, além de estar associada a problemas gerais de saúde, sono de baixa qualidade, redução da qualidade de vida e maior incidência de ansiedade e depressão. Ainda, pelo fato de a dor crônica ocasionar afastamento do trabalho, incapacidade temporária ou permanente, morbidade e elevados custos ao sistema de saúde, a dor tem sido considerada um problema de saúde pública (BRANDÃO JÚNIOR; BESSET, 2015; BRASIL, 2001; VASCONCELOS; ARAÚJO, 2018; ZILLIOX, 2017;).

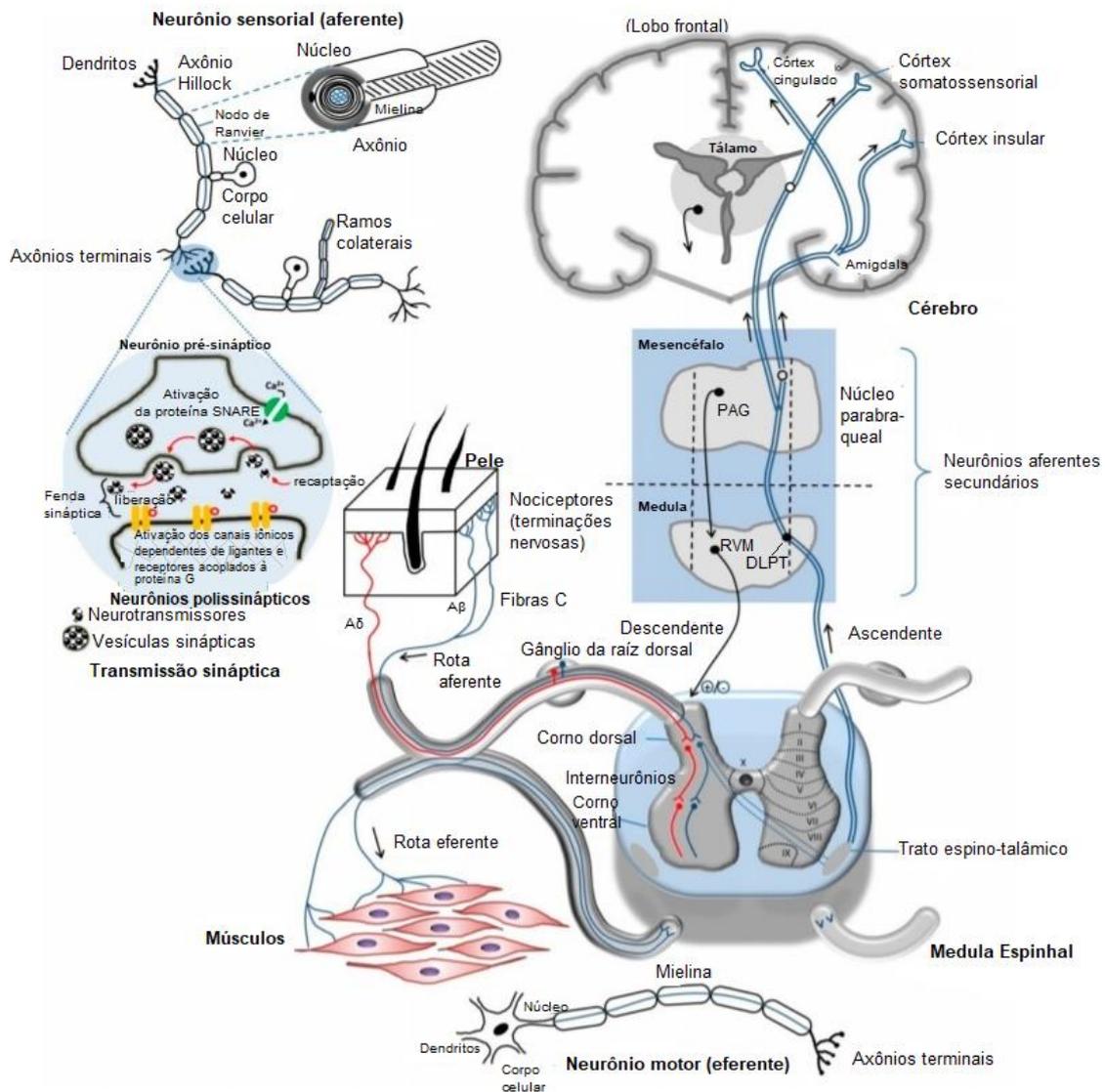
12.2 FISIOPATOLOGIA DA DOR NEUROPÁTICA

O componente fisiológico da dor é chamado de nociceção e, consiste basicamente de 4 elementos: transdução, transmissão, transformação ou plasticidade e percepção. De maneira resumida, a transdução se inicia por um estímulo externo nocivo (mecânico, térmico ou químico), captados pelos receptores de dor (nociceptores), que é convertido em sinal nociceptivo. Este sinal é então conduzido pelas fibras nervosas da periferia até a medula (neurônios de primeira ordem). Estes neurônios podem ser de três formas diferentes: fibras A β (fibras de diâmetro grande, mielinizadas e conduzem estímulos não nocivos); fibras A δ (fibras de diâmetro médio, mielinizadas e conduzem estímulos mecânicos e nocivos, por exemplo dor aguda) e fibras C (fibras de diâmetro pequeno, não mielinizadas e conduzem estímulos lentos como o estímulo químico e a dor difusa). Em seguida, o sinal ascende pela medula até o tálamo, através de neurônios de segunda ordem e então é conduzido por neurônios de terceira ordem do tálamo até o córtex somatossensorial. Os neurônios de terceira ordem formam uma complexa rede que inerva o tálamo, o mesencéfalo, o sistema límbico e a formação reticular. Esses centros nervosos são responsáveis pela localização e intensidade da dor, bem

como seus aspectos afetivos e cognitivos. A comunicação da informação nociceptiva entre neurônios ocorre por meio de neurotransmissores, que podem ser excitatórios (por exemplo: glutamato e substância P) ou inibitórios (por exemplo: GABA). Este processo de condução do sinal nociceptivo é chamado de transmissão. A transformação ou plasticidade é o mecanismo que modula o SNC principalmente pela ativação da via descendente da dor, que envolve as estruturas do córtex somatossensorial, o núcleo paraventricular do hipotálamo, a substância cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, núcleo magno da rafe e *locus coeruleus*, que inibem os neurônios nociceptivos da medula. A percepção ocorre quando o sinal nociceptivo é conduzido do tálamo para o córtex cerebral, onde ocorre o processamento, integrando respostas cognitivas e afetivas, desencadeando a consciência da dor (COHEN; MAO, 2014; KLAUMANN *et al.*, 2008).

O mecanismo de nocicepção está esquematicamente representado pela Figura 20.

Figura 20 - Mecanismo representativo da condução da nocicepção da periferia até o SNC



Fonte: Traduzido de Yam *et al.*, 2018

A dor neuropática é produzida pelo dano ao tecido nervoso, decorrente de eventos como compressão, infiltração, isquemia ou dano metabólico aos neurônios. A compressão mecânica do nervo desencadeia processos inflamatórios, imunológicos e isquêmicos, responsáveis pelo dano às fibras nervosas e, clinicamente, pela dor neuropática. O dano nervoso caracteriza-se pela aparição de hipersensibilidade (resposta exagerada a estímulos dolorosos), dor espontânea, parestesia (sensação anormal desagradável ocorrida sobre a pele), alodinia (dor

evocada por estímulos normalmente não dolorosos) mecânica ou por frio (IASP, 2020; KLAUMANN, 2008; TREEDE *et al.*, 2008).

A dor neuropática é frequentemente classificada como central ou periférica, dependendo do local da lesão, causando a dor. Essa dor é proveniente da sensibilização do sistema nervoso, tanto periférico quanto central (KLAUMANN, 2008; ZILLIOX, 2017).

Quando ocorre a lesão nos nervos periféricos, ocorre a indução de descargas rápidas e intensas, mesmo na ausência do estímulo, ativando os receptores N-metil D-aspartato (NMDA – receptor glutamatérgico). Logo após o trauma, as extremidades do nervo lesionado “aderem-se” ou “emitem novas conexões” aproximando-se de neurônios não lesionados, formando uma estrutura de crescimento irregular denominada neuroma, que pode ser o centro direto ou indireto (por neurônios não lesionados) de descargas ectópicas e espontâneas e hipersensibilidade a estímulos mecânicos. O dano neuronal desencadeia alteração fenotípica, que estimula um aumento da expressão de peptídeos pró-inflamatórios; também leva a um aumento do número de canais para sódio e cálcio presentes no local (responsáveis pelo influxo de íons e despolarização da membrana, ocasionando o impulso nervoso). Outras causas da sensibilização periférica incluem surgimento de neurônios simpáticos no gânglio da raiz dorsal da medula e aumento da capacidade de resposta frente a mediadores inflamatórios liberados pelas células danificadas. Este processo é conhecido como sensibilização periférica (KLAUMANN *et al.*, 2008; ZILLIOX, 2017).

A sensibilização central refere-se ao aumento da excitação e redução da inibição do SNC associadas à dor neuropática. Repetidas conduções de impulsos pelas fibras C periféricas resultam em excitabilidade aumentada da medula espinhal. Em adição, lesões nas estruturas do SNC podem alterar o processamento sensorial (ZILLIOX, 2017).

É importante ressaltar que a dor apresenta componentes afetivos bastante significativos em humanos. No entanto, a maioria dos modelos experimentais pré-clínicos de dor considera a intensidade da sensação dolorosa como sendo diretamente proporcional à amplitude da resposta comportamental do animal, por não conseguir mencionar os aspectos psicológicos afetivo-emocionais que influenciam a intensidade da dor percebida. Em animais, a dor é mais

adequadamente definida como nocicepção, que constitui o processo pelo qual um animal responde a estímulos ditos nociceptivos (LOESER; TREEDE, 2008).

12.3 TRATAMENTO PARA DOR NEUROPÁTICA

Uma vez que a dor neuropática costuma responder pouco ao tratamento com analgésicos comuns, o tratamento preconizado para a dor neuropática é baseado principalmente no tratamento dos sintomas, seguindo a recomendação do Grupo de Interesse Especial em Dor Neuropática (NeuPSIG – do inglês *The Special Interest Group on Neuropathic Pain*) da IASP: primeira linha – gabapentinoides (gabapentina e pregabalina), antidepressivos tricíclicos (ADT) (amitriptilina é a mais prescrita) e inibidores da recaptção de noradrenalina e serotonina (ISRSN) (duloxetina é a mais prescrita); segunda linha – opioides (tramadol, tapentadol), lidocaína, capsaicina; terceira linha – opioides fortes (morfina e oxicodona) e toxina botulínica do tipo A (BTX-A). A maioria dos tratamentos disponíveis para dor neuropática tem eficácia moderada e apresentam efeitos colaterais que limitam seu uso (CAVALLI *et al.*, 2019). O manejo farmacológico preconizado para a dor neuropática está descrito com mais detalhes na Figura 21.

Os melhores resultados dos gabapentinoides são obtidos nos tratamentos de dor diabética, neuralgia pós-herpética, lesão na medula espinhal e síndrome do membro fantasma. Já os ADT se mostram eficazes para o tratamento de neuropatia dolorosa, dor por lesão nervosa, neuralgia pós-herpética, dor pós-parto central e dor após a lesão da medula espinhal (CAVALLI *et al.*, 2019).

Figura 21 - Manejo farmacológico preconizado para a dor neuropática

Terapia	Classe farmacológica	Medicamentos	Faixa de dose	Mecanismo de ação	Efeitos adversos
Primeira linha	Gabapentinoídes	Gabapentina	150-60 mg/dia	Se ligam à subunidade $\alpha 2-\delta$ dos canais para cálcio dependentes de voltagem, reduzindo o influxo de cálcio nas células	Letargia, vertigem, edema periférico, visão turva Letargia, vertigem, edema periférico, aumento de peso
		Pregabalina	300-3600 mg/dia		
	ADT	Amitriptilina	10-150 mg/dia	Inibem a recaptação de serotonina e noradrenalina nos terminais pré-sinápticos, além de exercerem efeito sobre receptores colinérgicos, adrenérgicos e histaminérgicos	Efeitos anticolinérgicos, prolongação do intervalo QT (arritmia), risco de suicídio, retenção urinária
	ISRSN	Duloxetina	20-120 mg/dia		
		Venlafaxina	150-225 mg/dia	Inibem a recaptação de serotonina e noradrenalina a nível sináptico	Náusea, letargia, constipação, ataxia, boca seca Náusea, vertigem, letargia, hiperidrose, hipertensão
	Opioides	Tramadol	25-400 mg/dia		
Tapentadol		50-600 mg/dia	Inibem a transmissão nociceptiva através da ligação com receptores μ -opioides pré e pós-sinápticos	Náusea/vômito, constipação, letargia, convulsões, ataxia	
Segunda linha	Tratamento tópico	Lidocaína	5% pomada ou gel	Bloqueia canais para Na^+ dependente de voltagem, reduzindo localmente descarga nervosa espontânea e ectópica	Eritema local, prurido e erupção cutânea Dor, eritema, prurido, raros casos de pressão sanguínea aumentada
		Capsaicina	8% pomada	Potente antagonista do receptor vaniloide transiente tipo 1 (TRPV1)	
		Morfina	10-120 mg/dia		
Terceira linha	Opioides fortes	Oxicodona	10-120 mg/dia	Inibem a transmissão nociceptiva através da ligação com receptores opioides pré e pós-sinápticos	Náuseas, vômitos, constipação, sonolência e letargia Náuseas/vômitos, constipação, letargia, controle respiratório
		Neurotoxina	Toxina botulínica A	25-300 U BTX-A em salina 0,9%	

Fonte: Adaptado de Cavalli *et al.* (2019)

Muitos estudos clínicos tem usado cetamina, memantina e antagonistas de receptores NMDA para o manejo da dor neuropática, no entanto, essas substâncias ainda não foram aprovadas pelo FDA para esta finalidade. Ainda, pode-se observar a utilização de derivados da *Cannabis sativa* para a modulação da dor neuropática e também a utilização de técnicas de estimulação não invasiva do cérebro transcraniano (CAVALLI *et al.*, 2019).

Através dos estudos pré-clínicos, utilizando modelos animais para dor neuropática, tem sido observado novas abordagens para o manejo desse tipo de dor, tais como: antagonistas do receptor de potencial transitório de anquirina 1 (TRPA1); agonistas de receptores da micróglia (receptores purinérgicos); medicamentos aprovados para outros usos, mas que apresentaram eficácia em modelos de dor neuropática; compostos de origem natural, além da utilização de nanocarreadores. O uso desses sistemas de liberação baseados em nanotecnologia se mostra promissor e com benefícios clínicos para o manejo da dor (CAVALLI *et al.*, 2019).

12.4 MODELOS EXPERIMENTAIS

Modelos animais são fundamentais para a compreensão dos mecanismos envolvidos na dor neuropática (central ou periféricos) e para o desenvolvimento de terapias eficazes e adequadas para o seu manejo, já que a avaliação da dor neuropática é complicada, uma vez que a etiologia e as manifestações são variadas e a maioria dos estímulos necessários para induzir esse tipo de dor em humanos produz danos nervosos irreversíveis, pelos próprios mecanismos fisiopatológicos. Além disso, modelos animais são importantes, pois permitem compreender melhor sobre o mecanismo de funcionamento dos fármacos, possibilitando a realização de estudos pré-clínicos (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011; SHEAHEN, 2018; SOUSA *et al.*, 2016).

Diferentes modelos animais têm sido desenvolvidos para mimetizar as diferentes etiologias e, conseqüentemente, a diversidade de manifestações da neuropatia, que incluem: lesão periférica ou central; dor neuropática induzida por quimioterápicos; dor neuropática induzida por câncer e vírus da imunodeficiência humana (HIV - do inglês *human immunodeficiency virus*); dor neuropática pós-

herpética; dor neuropática induzida por diabetes e ingestão crônica de etanol; neuralgia do trigêmeo e dor neuropática orofacial (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011; SOUSA *et al.*, 2016). Os principais modelos utilizados estão resumidos na Figura 22.

Somado a isso, os modelos baseados em ligaduras de nervos periféricos são os mais comumente utilizados, pois apresentam como vantagem a facilidade e rapidez do procedimento. Dentre estes, o modelo de constrição crônica do nervo ciático (CCI) é um dos mais empregados (CHAPLAN *et al.*, 1994; JAGGI; JAIN; SINGH, 2011; SOUSA *et al.*, 2016).

Figura 22 - Principais modelos animais de dor neuropática

Nome do modelo	Tipos de lesão	Animais
Axotomia	Transecção completa do nervo ciático	Ratos
Constricção crônica do ciático (CCI)	4 ligaduras frouxas ao redor do nervo ciático	Ratos e camundongos
Constricção parcial do ciático (modelo de Seltzer)	Ligadura apertada de 1/3 a 1/2 do nervo ciático	Ratos e camundongos
Ligadura dos nervos espinhais	a) Ligadura apertada dos nervos L5/L6 b) Ligadura apertada do nervo L7	a) Ratos b) Macacos
Lesão poupadora de nervos	Axotomia dos nervos tibial e fibular comum	Ratos e camundongos
Transecção dos nervos tibial e sural	Axotomia dos nervos tibial e sural	Ratos
Ligação do nervo fibular comum	Ligação do nervo fibular comum	Camundongos
Crioneurólise ciática	Congelamento do nervo ciático	Ratos
Ressecção do tronco caudal	Ressecção do tronco caudal	Ratos e camundongos
Neurite inflamatória do ciático	Injeção de zimosan e fator de necrose tumoral (TNF- α) ao redor do nervo ciático	Ratos e camundongos
Lesão do ciático induzida por balão	Implantação de um balão de polietileno ao redor do nervo ciático	Ratos e camundongos
Lesão do ciático induzida por fotoquímica	Trombose em pequenos vasos que suprem o nervo ciático por corante fotossensibilizante e laser	Ratos e camundongos
Lesão do ciático induzida por laser	Redução do suprimento sanguíneo do nervo ciático mediada por laser	Ratos
Lesão espinhal por contusão	Deixar cair um peso sob a medula espinhal exposta	Ratos e camundongos
Lesão excitotóxica da medula espinhal	Injeções intraespinhais de aminoácidos excitatórios	Ratos e camundongos
Lesão fotoquímica da medula espinhal	Trombose nos vasos que suprem a medula espinhal por corante fotossensibilizante e laser	Ratos
Hemisseção espinhal	Laminectomia dos segmentos T11-T12	Ratos
Indução medicamentosa a) Agentes anticâncer (vincristina, cisplatina, oxaliplatina, paclitaxel) b) Agentes anti-HIV (2,3-dideoxicitidina, didanosina)	Lesão direta dos fármacos nos nervos periféricos	Ratos e camundongos
Neuropatia induzida por diabetes a) indução por estreptozotocina b) modelos genéticos	Alterações nos nervos induzidas por hiperglicemia persistente	Ratos e camundongos
Modelos de dor por câncer a) neoplasia nos ossos fêmur, calcâneo, tíbia e úmero b) dor neuropática do câncer c) câncer de pele	a) Inoculação de células cancerosas nos respectivos ossos b) Crescimento de um tumor nas proximidades do nervo ciático c) Injeção de células de melanoma na região plantar da pata traseira	a) Ratos e camundongos b) Camundongos c) Camundongos
Neuropatia induzida por HIV	Inoculação da proteína gp120 ao nervo ciático	Ratos
Neuralgia pós-herpética a) vírus Varicella zoster b) vírus Herpes simplex c) modelo não viral	a) Injeção de células virais na almofada da pata b) Depleção de capsaicina sensível c) Aferentes com resiniferotoxina	a) Ratos e camundongos b) Ratos c) Ratos
Neuropatia alcoólica	Administração de etanol por período prolongado (cerca de 70 dias)	Ratos
Neuropatia induzida por piridoxina	Administração de piridoxina por longos períodos	Cachorros e ratos
Neuralgia do trigêmeo	a) Compressão do gânglio do trigêmeo b) Lesão por constricção crônica do nervo infraorbital	a) Ratos b) Ratos
Neuropatia orofacial	Injeção de formalina, carragenina nas articulações temporomandibulares e maxila	Ratos e camundongos
Neuropatia induzida por acrilamida	Administração de acrilamida por período prolongado	Ratos

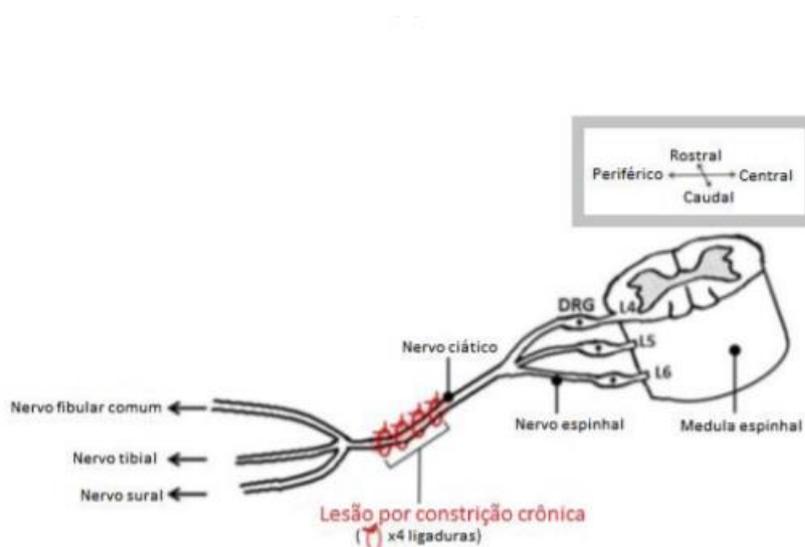
Fonte: Traduzido de Jaggi, Jain, Singh (2011).

12.4.1 Constricção crônica do nervo ciático (CCI)

Bennet e Xie (1988) propuseram inicialmente esse método para indução de dor neuropática, o qual consiste na colocação de quatro ligaduras (nós) frouxas ao

redor do nervo ciático, imediatamente antes da sua trifurcação, não muito apertados, de maneira que a irrigação epineural não seja interrompida (FIGURA 23).

Figura 23 - Diagrama esquemático ilustrando a posição das ligaduras no modelo CCI no nervo ciático



Fonte: Traduzido de Austin, Wu e Moalem-Taylor (2012).

Esta constrição do nervo ciático está associada à edema intraneural, isquemia focal e degeneração Walleriana (degeneração neural progressiva), que são decorrentes de reação imune desencadeada pelo fio de sutura da ligadura. Esses processos suscitam sinais comportamentais de dor espontânea, similares aos observados em humanos, como proteção e/ou excesso de lambidas da pata lesada, mancar da pata traseira lesionada ou ainda evitar colocar peso do lado da lesão. Além disso, nesse modelo ocorre o aparecimento de dor evocada por estímulo mecânico ou térmico, que qualifica a hiperalgesia mecânica e térmica, hiperatividade química e alodinia (dor devido a um estímulo que normalmente não provoca dor) ao frio na primeira semana após a indução e ocorre alteração dos parâmetros posturais assimétricos relativos à dor máxima durante a segunda semana da cirurgia. Estas alterações permanecem por pelo menos 7 semanas após a CCI (BENNET; XIE, 1988; DOWDALL; ROBINSON; MEERT, 2005).

Além disso, um estudo eletrofisiológico no modelo de CCI feito por Gabay *et al.* (2004) demonstrou que este modelo ocasiona lesão nervosa parcial que

desencadeia sensibilização das fibras A δ e C, que desempenham um papel importante na iniciação e na manutenção do comportamento doloroso.

Ainda, segundo Bennet e Xie (1988), o modelo de CCI produz mononeuropatia periférica unilateral e que os sintomas observados neste modelo correspondem à causalgia ou síndrome complexa regional em humanos.

De acordo com Chaplan *et al.* (1994), as limitações deste modelo são decorrentes das variações de procedimento, tais como tensão exata das ligaduras e a fração precisa do nervo a ser ligado, desencadeando tanto diminuição da reprodutibilidade do estado neuropático resultante (início, duração e intensidade) quanto redução da garantia de produzir uma mudança previsível em todos os animais.

12.4.2 Modelo para avaliação da resposta antinociceptiva

Para avaliar as alterações comportamentais resultantes de cada modelo de nocicepção, técnicas de mensuração foram criadas. As principais técnicas de avaliação da resposta nociceptiva estão sumarizadas na Figura 24.

Chaplan *et al.* (1994) observaram que a alodinia tátil (semanticamente equiparado a alodinia mecânica) é um componente mais visível da dor neuropática e, sendo assim, provavelmente este é um componente clinicamente mais importante da dor neuropática. Uma das técnicas bastante utilizada para avaliação da alodinia mecânica é o teste de von Frey de filamentos.

Figura 24 - Modelos para avaliação da resposta antinociceptiva

Nome do modelo	Tipo de estímulo	Manifestação da nocicepção	Referência
Contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,1N	Químico	Nocicepção manifesta por injeção de agente algésico	Whittle et al. (1964)
Teste da formalina	Químico	Nocicepção manifesta por injeção de agente algésico	Hunnskaar; Hole (1987)
Teste da placa quente (<i>hot plate</i>)	Térmico	Nocicepção manifesta por reflexo da retirada da pata	Kuraishi et al. (1983)
Teste da retirada da cauda (<i>tail flick</i>)	Térmico	Nocicepção manifesta por reflexo da retirada da cauda	Kuraishi et al. (1983)
Teste de Hargreaves	Térmico	Hiperalgésia térmica por fonte de luz infravermelha na pata traseira	Hargreaves et al. (1988)
Teste de Randall-Selitto	Mecânico	Hiperalgésia mecânica por pressão crescente na pata	Randall; Selitto (1957)
Teste de von Frey (filamento e eletrônico)	Mecânico	Hiperalgésia mecânica por pressão crescente na pata	von Frey (1896) - filamento Jensen et al. (1986) - eletrônico Möller; Johansson; Berge (1998) - eletrônico
Teste de Randall-Selitto modificado	Mecânico	Hiperalgésia mecânica por pressão crescente na pata	Randall; Selitto (1957), modificado por Ferreira; Lorenzetti; Correa (1978)

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

12.4.2.1 Teste de von Frey de filamentos

O uso de filamentos de von Frey tem sido empregado para avaliação da sensibilidade tecidual frente a um estímulo mecânico na clínica médica e em experimentos laboratoriais. Neste último grupo, o uso mais observado é quando se objetiva investigar a ação antinociceptiva das substâncias (SILVA *et al.*, 2013; VON FREY, 1896).

A sua vantagem é a inexistência da administração de outras substâncias químicas (algésicas) concomitantes ao tratamento e a capacidade de determinar com precisão e segurança o limiar de retirada da pata em animais acordados e sem contenção parcial (CHAPLAN *et al.*, 1994; GRAVA *et al.*, 2010).

12.4.3 Modelos para caracterização da atividade farmacológica no SNC

Os testes que caracterizam a atividade de substâncias no SNC têm por objetivo avaliar o comportamento de animais após a administração dessas substâncias. Nestes testes são realizados o monitoramento do comportamento para identificar uma possível alteração no comportamento convencionalizado como normal, que pode ser sugestivo de alteração na atividade do SNC. Como exemplo destes testes, destacam-se o modelo de rota-rod, o modelo de campo aberto e o teste de sono induzido por barbitúrico (ALMEIDA *et al.*, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2008; PAŃCZYK *et al.*, 2018; RAHMAN *et al.*, 2015).

12.4.3.1 Teste de rota-rod

O teste de rota-rod foi proposto inicialmente por Dunham e Miya (1957) e consiste em colocar o animal em uma barra giratória elevada por um determinado período a fim de verificar a sua capacidade de equilibrar-se e permanecer sobre esta barra. A alteração da coordenação motora é indicada pela incapacidade do animal em permanecer na barra giratório pelo período estabelecido.

Rosland, Hunskaar e Hoole (1990) relatam que a maioria dos testes de nocicepção em animais dependem de respostas motoras. Então, a avaliação motora deve ser realizada para que o efeito antinociceptivo seja validado.

12.4.3.2 Teste de campo aberto

O teste de campo aberto foi inspirado nas propostas de Hall (1934) e validado por Archer (1973) e consiste em colocar o animal no centro de uma arena quadrada ou circular e avaliar o seu comportamento locomotor, através dos parâmetros de distância percorrida, tempo de imobilidade, frequência que o animal usa as patas dianteiras para limpeza (*grooming* ou autolimpeza), número de vezes que o animal se levanta sob as patas traseiras (*rearing* ou exploração vertical) (HALL, 1934; ARCHER, 1973).

Este teste tem sido bastante utilizado para avaliar efeitos sedativos ou depressores de substâncias sobre o SNC, uma vez que o animal em seu estado ativo do SNC tende a explorar o local (distância percorrida e *rearing* maiores). Sendo assim, quando uma substância apresenta efeito depressor do SNC, ocorre uma redução do comportamento locomotor, ou seja, o animal tende a ficar mais letárgico, explorando menos o ambiente (redução da distância percorrida e do *rearing*) e tende a ficar mais tempo imóvel (CORREA et al., 2003; MEDEIROS et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2008; REZVANI et al., 2011).

12.4.3.3 Teste de sono induzido por barbitúricos

O teste de sono induzido por barbitúricos foi proposto inicialmente por Carlini e Burgos (1979) e consiste na administração de algum barbitúrico (que é conhecidamente um depressor do SNC) após a administração da substância em teste, para indução do sono e avaliação do tempo de sono. Este teste é bastante utilizado para a verificação de atividade depressora e/ou sedativa de fármacos ou extratos de plantas, por ser um teste específico. Além disso, este teste baseia-se no fato de que, em geral, os fármacos depressores do SNC aumentam o tempo de sono induzido por barbitúricos (OLIVEIRA *et al.* 2008; MEDEIROS *et al.*, 2018).

13 MÉTODOS

13.1 ANIMAIS

Foram utilizados 120 ratos machos, raça Wistar, pesando entre 220-250 g, obtidos no Biotério da Universidade Federal de Alfenas, aprovado pelo Comitê de Ética Animal local (Protocolo nº57/2016) (ANEXO A). Todos os animais foram submetidos às mesmas condições ficando em caixas de polipropileno, com o máximo de cinco animais por caixa, mantidos em sala com temperatura ($23^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade controladas (70%) e ciclo claro-escuro a cada 12 horas. Os animais tiveram livre acesso à ração e água. Além disso, os animais foram ambientados nas caixas por 7 a 10 dias antes de qualquer procedimento. Todos os experimentos foram efetuados dentro do ciclo circadiano dos animais, respeitando o ciclo claro, compreendido entre o período de 7 e 19 horas.

13.2 MEDICAMENTOS E SUBSTÂNCIAS

Todas as substâncias foram preparadas ou diluídas imediatamente antes da administração. O volume administrado foi calculado com base no peso de cada animal.

a) PREGABALINA (PG)

- Pregabalina, Musgo Farmácia de Manipulação, Brasil.

- 10 mg/kg, via oral (V.O.), dose única, em água ultrapura (RODRIGUES, 2016)

A dose de PG foi escolhida com base em estudos prévios da autora (RODRIGUES, 2016). A dose escolhida já apresenta efeito antinociceptivo e é possível a quantificação do fármaco.

b) NANOPARTÍCULA POLIMÉRICA COM PREGABALINA (NP PG)

- 10 mg de PG/kg, V.O., dose única (em NP preparada conforme o item 5.1.2, no dia da administração)

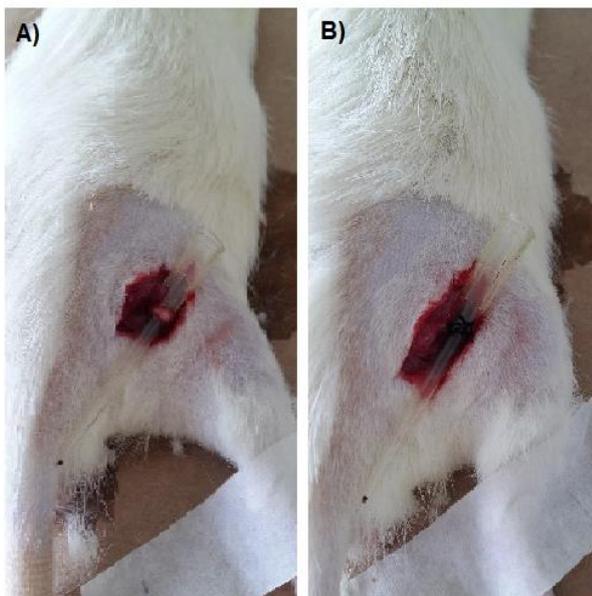
- c) **ÁGUA ULTRAPURA**
- Veículo da PG, V.O., dose única - volume correspondente ao administrado de PG em solução
 - Foi escolhida a utilização de água ultrapura para mimetizar a administração em seres humanos.
- d) **NANOPARTÍCULA VAZIA (NP VAZ)**
- Veículo da NP PG (nanopartícula sem PG, preparada conforme o item 5.1.2, no dia da administração), V.O., dose única – volume correspondente ao administrado de NP PG.
- e) **CETAMINA**
- Cloridrato de cetamina 10% injetável, Linavet, Brasil.
 - 90 mg/Kg, intraperitoneal (I.P.) (CENTRO DE BIOTERISMO DA UNIFAL-MG, 2018).
- f) **XILAZINA**
- Xilazina injetável, Hertape Calier Saúde Animal S.A, Brasil.
 - 10 mg/Kg, I.P. (CENTRO DE BIOTERISMO DA UNIFAL-MG, 2018).
- g) **TIOPENTAL**
- Tiopental sódico, Cristália, Brasil.
 - 40 mg/kg, em água para injeção, I.P. (CENTRO DE BIOTERISMO DA UNIFAL-MG,2018).
- h) **ISOFLURANO**
- Isoflurano, Cristália, Brasil.
 - 8%, inalatório - para a eutanásia do animal (CENTRO DE BIOTERISMO DA UNIFAL-MG, 2018).

13.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NP PG

Para a avaliação do efeito antinociceptivo da nanopartícula de PG foram utilizados 48 animais, os animais (n= 12 por grupo, 6 operados e 6 falso-operados ou *sham*) foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: NP PG; PG; NP VAZ e ÁGUA e foram submetidos à constrição crônica do nervo ciático, como descrito por Bennet e Xie (1988), para indução de dor neuropática.

Resumidamente, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e o efeito anestésico foi confirmado antes do início do procedimento cirúrgico. Em seguida, o animal foi colocado em decúbito ventral e o nervo ciático direito foi exposto (imediatamente antes da sua trifurcação). Quatro ligaduras foram feitas ao redor do nervo utilizando fio de sutura de seda, distantes entre si cerca de 1 mm. Cada ligadura foi feita com um nó duplo, ligeiramente apertado até que o nó não deslizasse pelo nervo e não interrompesse o fluxo sanguíneo epineural (FIGURA 23 e FIGURA 25). O nervo foi recolocado na sua posição anatômica e a incisão foi fechada e limpa. Para os animais *sham* não houve colocação da ligadura, somente a exposição do nervo. Os animais ficaram em observação até o retorno da anestesia.

Figura 25 - Procedimento cirúrgico de CCI



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: A) exposição do nervo ciático; B) Ligaduras de seda ao redor do nervo ciático

Para a avaliação experimental da resposta nociceptiva, os animais passaram por testes de alodinia mecânica (avaliação do limiar de retirada da pata). A avaliação do limiar de retirada da pata foi feita por meio do aparato de teste, que consiste em caixas individuais de acrílico sobre uma grade de metal que dá acesso a pata, e de filamentos de von Frey, cujos diâmetros dos filamentos são calibrados para induzir força específica: 0,6, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 26 e 60g (FIGURA 26 e 27).

A avaliação da alodinia mecânica foi realizada conforme descrito por Detlof *et al.* (2010), que resumidamente consiste na aplicação de uma série de filamentos com diferentes diâmetros na região plantar da pata direita traseira do animal, de forma perpendicular à pata (FIGURA 28), por seis segundos. Foi considerado como indicativo do limiar de retirada a atitude de retirada da pata. Foram efetuados seis estímulos na pata direita (ipsilateral), iniciando por um filamento intermediário (6g) que seguido de resposta positiva era sucedido do filamento anterior (força menor) e seguido de resposta negativa era sucedido pelo próximo filamento (força maior), até que fossem completados os seis estímulos (DIXON, 1980). A pata esquerda (contra lateral) não foi avaliada.

Figura 26 - Animais no aparato de teste



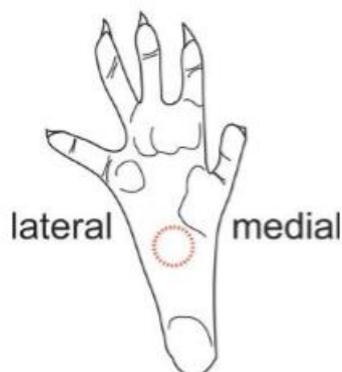
Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 27 - Filamentos de von Frey para animais



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Figura 28 - Diagrama da área plantar da pata utilizada para a avaliação da alodinia mecânica

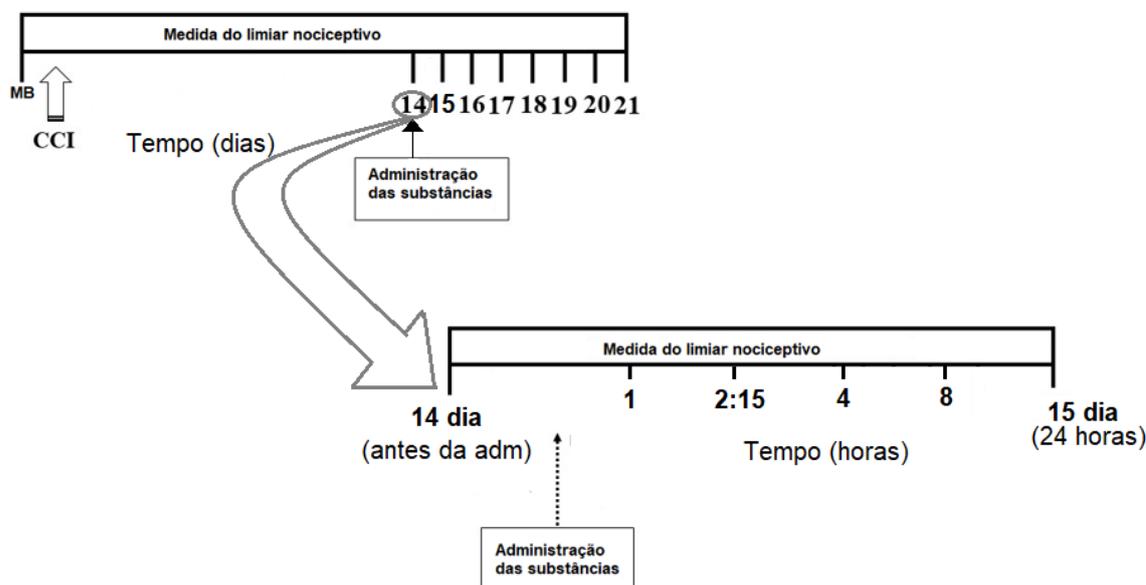


Fonte: Adaptado de Austin, Wu e Moalem-Taylor (2012).

Primeiramente, os animais foram colocados individualmente no aparato (FIGURA 26) e mantidos por 30 minutos para a aclimação ao ambiente para que então fosse dado início ao experimento.

A avaliação da alodinia mecânica foi realizada com base em experimentos prévios, descritos anteriormente pela autora (RODRIGUES, 2016), imediatamente antes do procedimento cirúrgico (medida basal – MB), no 14º dia pós-operatório, onde os animais apresentam a maior alodinia mecânica (ou seja, o menor limiar nociceptivo, determinado por experimento prévio) (RODRIGUES, 2016), e neste dia foram administradas as substâncias (PG, NP PG, NP VAZ e água) e o limiar nociceptivo foi avaliado 1, 2:15, 4 e 8 h após a administração das substâncias no 14º dia (RODRIGUES, 2016). A avaliação do limiar nociceptivo foi feita também 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 h após a administração das substâncias, ou seja, do 15º ao 21º dia após a administração das substâncias, com intervalos de 24 horas (FIGURA 29). As avaliações sempre ocorreram no período claro do ciclo circadiano, com início sempre às 8 horas.

Figura 29 - Delineamento experimental do protocolo de medidas do limiar nociceptivo



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: Primeiramente, o limiar basal (MB) de cada animal foi obtido. Depois, a dor neuropática foi induzida por CCI ou *sham* e novas medidas do limiar nociceptivo foram realizadas do 14º ao 21º dia após a CCI, com intervalos de 24 horas. As substâncias foram administradas por via oral, em dose única, no 14º dia após a CCI e o limiar nociceptivo foi avaliado após 1, 2:15, 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas da administração das substâncias.

Os resultados obtidos foram comparados por testes estatísticos, utilizando intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. Para comparar os dados entre o mesmo grupo de animais (CCI vs. SH), foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para comparar os dados dos diferentes tratamentos, utilizou-se análise de variância (ANOVA) de duas vias com medidas repetidas, com pós-teste de Newman-Keuls.

13.4 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR (TESTE DE ROTA-ROD)

Para a avaliação da coordenação motora e do equilíbrio foram utilizados 24 animais, os animais (n = 6 por grupo) foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: NP PG; PG; NP VAZ e água e foi utilizado um equipamento de Rota-rod (FIGURA

30). Os mesmos animais foram submetidos ao teste de campo aberto, realizando primeiramente os testes de campo aberto e em seguida os testes de rota-rod.

Figura 30 - Teste de Rota-rod em execução

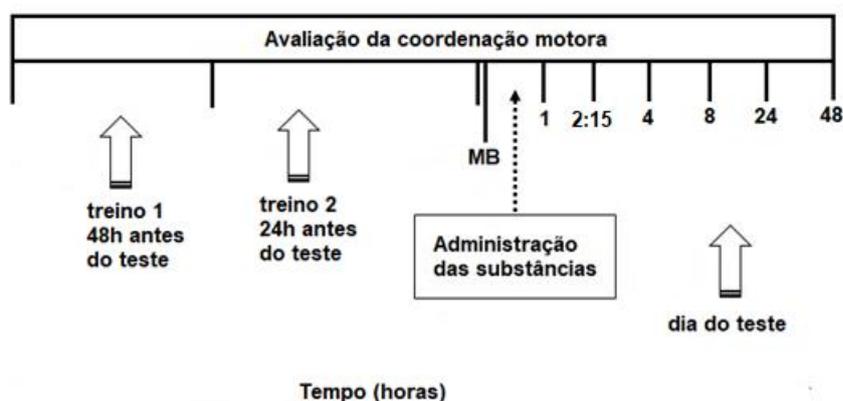


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Todos os animais foram submetidos a treino de dois dias, com três treinos por dia, para atingir um nível de desempenho constante. Durante este período, os animais foram treinados para caminhar contra o movimento de um tambor rotativo, com aceleração crescente de 5 a 25 rpm (no primeiro dia) e acelerando de 5 a 37 rpm (no segundo dia), durante um tempo máximo de 4 minutos. Após o treinamento, foi realizado um dia de teste, com velocidade acelerando de 5 a 37 rpm, durante um tempo máximo de 4 minutos (Adaptado de AQUINO JÚNIOR, 2019)

Foram realizadas medidas imediatamente antes da administração das substâncias (medida basal – MB) e, novas medidas foram realizadas após 1, 2:15, 4, 8, 24 e 48h após a administração das substâncias (FIGURA 31).

Figura 31 - Delineamento experimental do teste de rota-rod



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

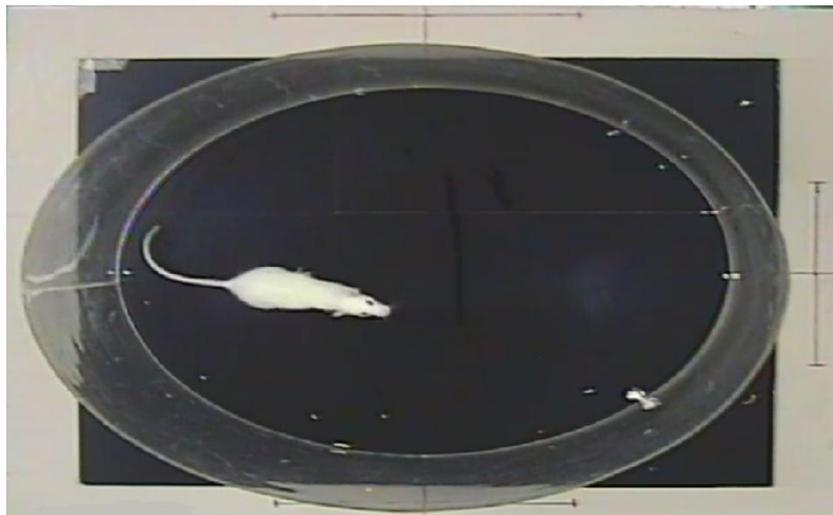
Legenda: 48 horas antes do dia do teste, os animais passaram por 3 ciclos de treino de 5 minutos cada (barra giratória com velocidade acelerando de 5 a 25 rpm). 24 horas antes do dia do teste, os animais passaram por 3 ciclos de treino de 5 minutos cada (barra giratória com velocidade acelerando de 5 a 37 rpm). No dia do teste, primeiro foi avaliada a coordenação motora basal dos animais (MB), em seguida as substâncias foram administradas por via oral e novas avaliações da coordenação motora foram realizadas 1, 2:15, 4, 8, 24 e 48 h após a administração das substâncias.

Os resultados obtidos foram comparados por testes estatísticos, utilizando intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. Para comparar os diferentes tratamentos, utilizou-se ANOVA de duas vias com medidas repetidas, com pós-teste de Newman-Keuls.

13.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO REDONDO

Para a avaliação da atividade geral de locomoção foram utilizados 24 animais, os animais ($n = 6$ por grupo) foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: NP PG; PG; NP VAZ e ÁGUA e foi utilizado uma arena circular acrílica transparente com 60 cm de diâmetro e 50 cm de altura, sob base de borracha preta (FIGURA 32). Os mesmos animais foram submetidos ao teste de rota-rod, realizando primeiramente os testes de campo aberto e em seguida os testes de rota-rod.

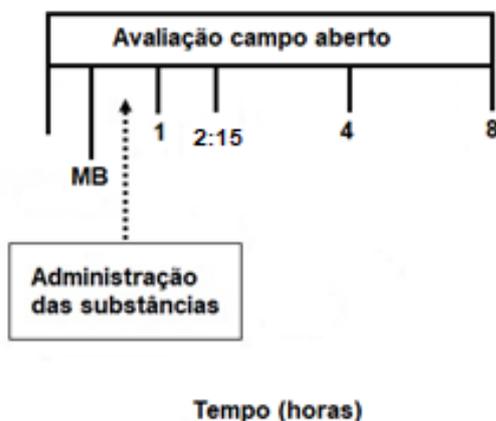
Figura 32 - Teste de campo aberto em execução



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Imediatamente antes da administração das substâncias e 1, 2:15, 4 e 8 horas após a administração das substâncias, cada animal foi colocado individualmente no centro da arena (FIGURA 33) e ao longo de 5 minutos, os comportamentos dos ratos foram registrados por filmadora digital para posterior análise. Os animais tiveram o desempenho avaliado pelos seguintes parâmetros: frequência de locomoção (distância percorrida), tempo de imobilidade e frequência dos movimentos de exploração (*rearing* ou número de vezes que o animal se ergue sobre suas patas traseiras). O equipamento foi limpo com solução de álcool 5% antes de cada teste, evitando influências de comportamento decorrentes do cheiro do animal anterior (de PAIVA *et al.*, 2010; NASSIS *et al.*, 1991; MELLO; LANGELOH; MELLO, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2013; RODRIGUES, 2016; VERONESI *et al.*, 2017).

Figura 33 - Delineamento experimental das avaliações comportamentais no campo aberto



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: Os animais não passaram por treino prévio. No dia do teste, foi feita a avaliação comportamental basal no campo aberto (MB), em seguida, as substâncias foram administradas por via oral e após 1, 2:15, 4 e 8 h após a administração das substâncias os animais foram submetidos a novas avaliações comportamentais no campo aberto.

A análise dos parâmetros distância percorrida e tempo de imobilidade foi realizada pelo software EthoVision XT9[®], versão 9.0. O parâmetro de *rearing* foi contabilizado por dois observadores, para validar a observação. Os resultados obtidos foram comparados por testes estatísticos, utilizando intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. Para comparar os dados entre os diferentes tratamentos, utilizou-se ANOVA de duas vias com medidas repetidas, com pós-teste de Newman-Keuls.

13.6 AVALIAÇÃO DO SONO INDUZIDO POR BARBITÚRICOS

Para a avaliação do sono induzido por barbitúrico foram utilizados 48 animais, os animais (n = 12, por grupo) foram aleatoriamente divididos em 4 grupos: NP PG; PG; NP VAZ e ÁGUA (controle) e 1h após a administração das substâncias, os animais receberam tiopental por via intraperitoneal. Foi cronometrado o tempo entre a perda do reflexo de endireitamento e o tempo até a recuperação do reflexo (tempo de anestesia) (adaptado de NASSIS *et al.*, 1991; MELLO; LANGELOH; MELLO, 2007; RODRIGUES, 2016).

Os resultados obtidos foram comparados por testes estatísticos, utilizando intervalo de confiança de 95% e nível de significância de 5%. Para a comparação dos dados dos diferentes tratamentos utilizou-se ANOVA de 1 via com pós-teste de Newman-Keuls.

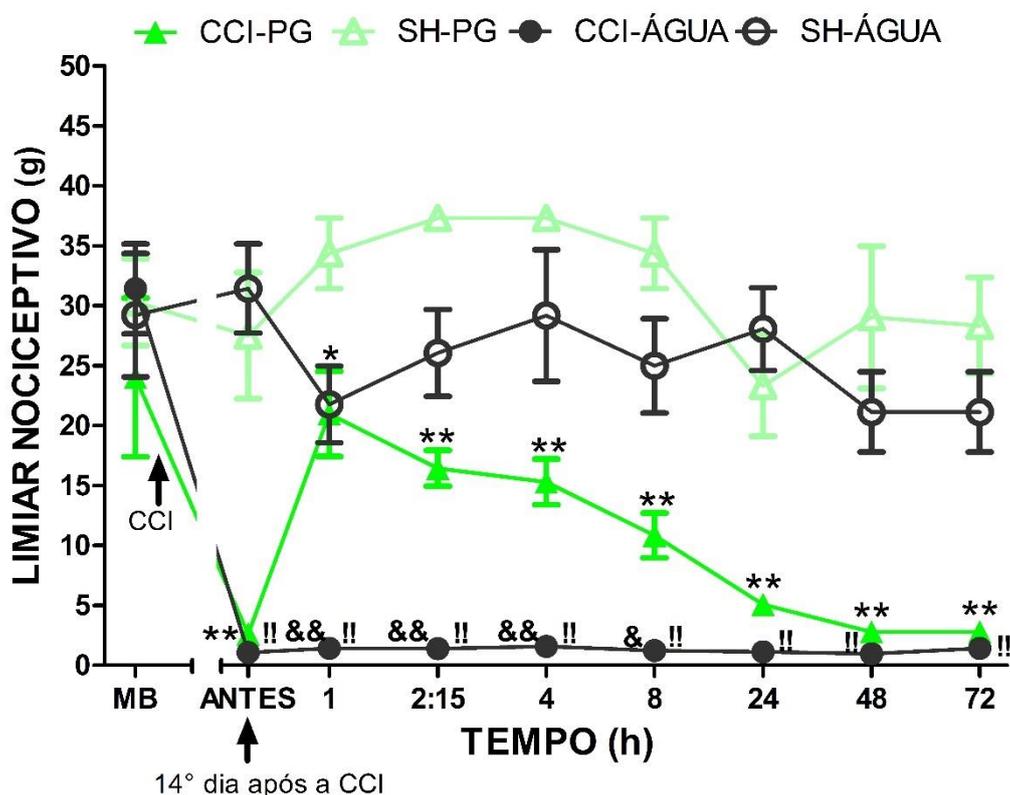
14 RESULTADOS E DISCUSSÕES

14.1 AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA NP PG

Os Gráficos 3 e 4 mostram a comparação do efeito antinociceptivo das substâncias entre os grupos com constrição crônica do nervo ciático (CCI) e *sham* (SH) e entre as substâncias e seus veículos, sendo possível observar que o procedimento de falsa- operação não induziu nocicepção ou alodinia, uma vez que não há ligaduras colocadas no nervo ciático, não desencadeando então a dor neuropática, visto que não houve diferença estatística entre os tempos avaliados para os animais SH. Quando se compara os animais CCI com os animais SH, foi possível observar que os animais CCI apresentaram alodinia mecânica significativa ($p < 0,01$) no 14º dia após a indução da dor neuropática, observada na análise imediatamente antes da administração das substâncias.

Pelo Gráfico 3 também foi possível observar que quando se compara o grupo SH-PG (pregabalina *sham*) com o grupo SH-ÁGUA, os grupos apresentaram o mesmo perfil de limiar de retirada da pata, visto que não houve diferença significativa. No entanto, quando se compara os grupos CCI-PG (constrição crônica do nervo ciático e recebeu pregabalina) e CCI-ÁGUA, foi possível verificar que o grupo CCI-PG apresentou efeito antinociceptivo significativo em 1, 2:15, 4 e 8h ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) após a sua administração.

Gráfico 3 - Efeito antinociceptivo da PG em solução durante 72 h após a sua administração



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

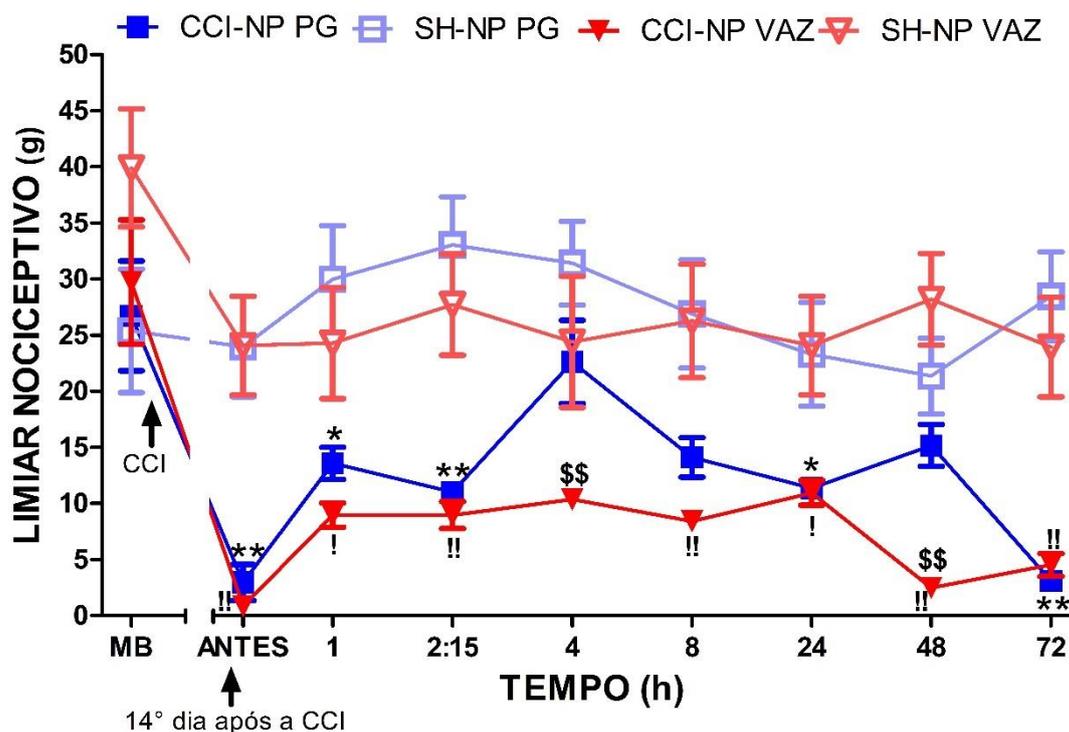
Legenda: Pregabalina: PG (10 mg/Kg, V.O.); ÁGUA: veículo da PG; CCI: constrição crônica do nervo ciático; SH: *sham*; MB: medida basal; ANTES: no 14º dia após a CCI, imediatamente antes da administração das substâncias; tempo experimental: 72 h após a administração das substâncias. Aplicou-se o teste de Mann-Whitney para a comparação entre os animais do mesmo grupo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparando o grupo CCI-PG com o grupo SH-PG; !! $p < 0,01$ comparando o grupo CCI-ÁGUA com o grupo SH-ÁGUA. & $p < 0,05$ e && $p < 0,01$ comparando o grupo CCI-ÁGUA com o grupo CCI-PG. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 6 animais.

Este resultado corrobora com diversos estudos que demonstraram que a PG é capaz de reduzir a alodinia mecânica em roedores. Além disso, o efeito de até 8 h observado no presente estudo vai de encontro ao observado por Pinedas-Faria *et al.* (2017), que também verificou efeito de até 8h após a administração de PG. (BEE; DICKENSON, 2008; FIELD *et al.*, 1999; NAKAI *et al.*, 2014; PINEDAS-FARIA *et al.*, 2017).

Pelo Gráfico 4 foi possível observar que da mesma forma que no Gráfico 3, ao se comparar os grupos SH-NP PG (nanopartícula contendo PG *sham*) e SH-NP VAZ (nanopartícula vazia – sem o fármaco – *sham*), os grupos apresentaram o

mesmo perfil de limiar de retirada da pata, por não haver diferença significativa. O interessante foi observado ao se comparar os grupos CCI-NP PG (constricção crônica do nervo ciático e recebeu nanopartícula contendo PG) com o grupo CCI-NP VAZ (constricção crônica do nervo ciático e recebeu nanopartícula sem o fármaco), já que só houve diferença significativa nos tempos 4 ($p < 0,01$) e 48h ($p < 0,01$) após a administração das substâncias, indicando que a NP VAZ possui potencial antinociceptivo, que pode ser vantajoso, principalmente pela presença de quitosana, já que este composto apresenta características analgésicas, como reportado por Okamoto *et al.* (2002). Apesar de administração da NP não ser intraperitoneal, como foi realizado pelos autores supracitados, o mecanismo principal envolvido no efeito analgésico da quitosana é a absorção de íons de prótons pela ionização do grupo amínico a NH_3^+ . O efeito antinociceptivo foi maior em 4 e 48h após a administração de NP PG, evidenciando o fato de esta nanopartícula ter liberado de forma modificada a PG, ocorrendo um sinergismo de efeito antinociceptivo entre quitosana e PG, favorecendo a administração de PG por meio deste nanocarreador. O tipo de efeito sinérgico observado (aditivo ou de potenciação) deve ser confirmado por outros estudos.

Gráfico 4 - Efeito antinociceptivo da nanopartícula de PG durante 72 h após a sua administração



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: NP: nanopartícula; NP PG: nanopartícula polimérica contendo PG (10 mg PG/Kg, V.O.); NP VAZ: nanopartícula sem PG (veículo da NP PG); CCI: constrição crônica do nervo ciático; SH: *sham*; MB: medida basal; ANTES: no 14º dia após a CCI, imediatamente antes da administração das substâncias; tempo experimental: 72 h após a administração das substâncias. Aplicou-se o teste de Mann-Whitney para a comparação entre os animais do mesmo grupo, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparando o grupo CCI-NP PG com o grupo SH-NP PG; !! $p < 0,01$ comparando o grupo CCI-NP VAZ com o grupo SH-NP VAZ. \$\$ $p < 0,01$ quando se comparou os grupos CCI-NP PG e CCI-NP VAZ. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média (\pm E.P.M.) de 6 animais.

Pelo Gráfico 5 foi possível observar que tanto o grupo CCI-PG quanto o grupo CCI-NP PG apresentaram-se significativamente diferente do grupo CCI-ÁGUA respectivamente nos tempos 1, 2:15, 4 e 8 h ($p < 0,01$; $p < 0,01$; $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente) e 1, 2:15, 4, 8, 24 e 48 h ($p < 0,05$; $p < 0,05$; $p < 0,001$; $p < 0,01$; $p < 0,05$ e $p < 0,05$, respectivamente), indicando que ambas as formulações apresentam efeito antinociceptivo e o efeito antinociceptivo é prolongado na NP PG.

Além disso, grupo CCI- NP PG apresentou efeito antinociceptivo significativamente maior do que os grupos CCI-PG, CCI-NP VAZ e CCI-ÁGUA no tempo 48 h ($p < 0,01$) após a administração das substâncias, demonstrando um efeito antinociceptivo prolongado, resultante da liberação da pregabalina da matriz

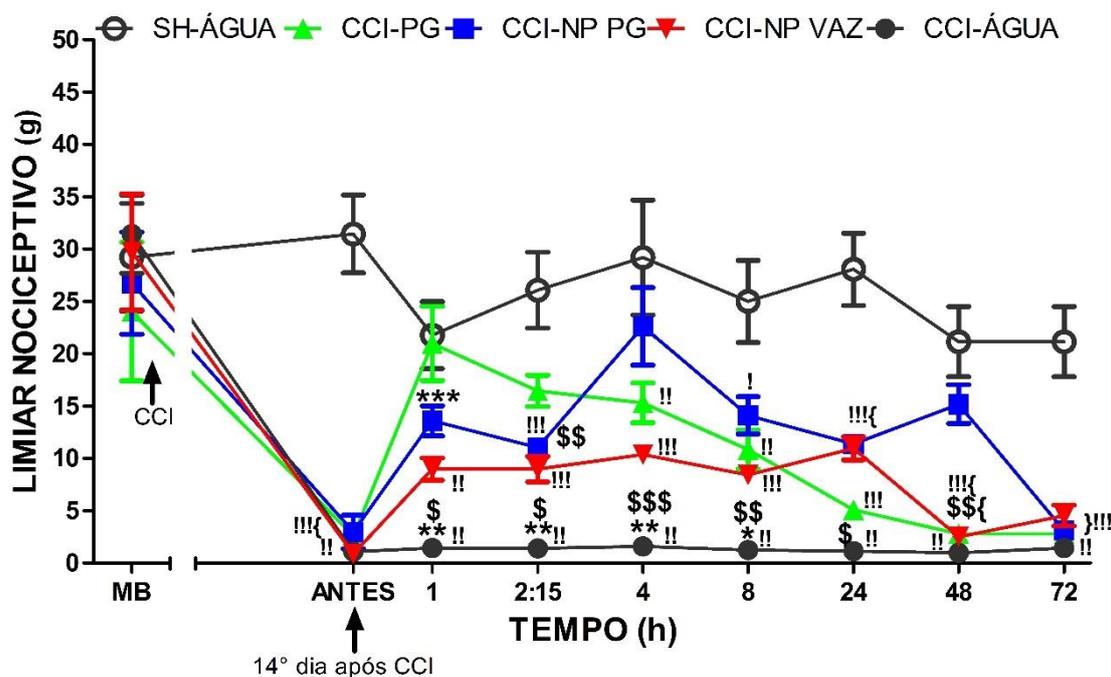
polimérica. Somado a isso, foi possível observar que quando se comparou os grupos CCI-PG e CCI-NP PG, o perfil antinociceptivo foi semelhante, por não haver diferenças significativas, exceto 48 h após a administração das substâncias ($p < 0,01$), como citado anteriormente, indicando que ocorreu liberação prolongada de PG. Dessa forma, é possível concluir que a matriz polimérica formada no preparo da nanopartícula é eficaz para sustentar a liberação de PG, possibilitando uma frequência de administrações menor do que a PG em solução. Este perfil inicial semelhante da NP PG com PG pode ser resultado de a taxa de associação ter sido estimada em aproximadamente 44% (item 6.2.2), indicando a presença de fármaco livre no meio.

O grupo CCI-PG só apresenta efeito antinociceptivo significativamente maior do que o do grupo CCI-NP VAZ 1 h ($p < 0,01$) após a administração das substâncias, o restante das avaliações apresentou perfil antinociceptivo semelhante, já que não houveram diferenças significativas. Esse perfil semelhante entre PG e NP VAZ é devido à ocorrência de efeito antinociceptivo da quitosana presente na formulação NP VAZ, como descrito por Okamoto *et al.* (2002). Este fato da NP VAZ apresentar efeito antinociceptivo é bastante vantajoso, pois possibilita que o próprio veículo da NP PG contribua para a redução da nocicepção.

Além disso, foi possível observar que CCI-PG foi capaz de produzir limiar de retirada da pata similar ao grupo SH-ÁGUA nos tempos 1 e 2:15 h após a administração das substâncias, já o grupo CCI-NP PG foi capaz de produzir limiar de retirada da pata similar ao grupo SH-ÁGUA nos tempos 4 e 48 h após a administração das substâncias, mostrando liberação prolongada da PG. Já CCI-NP VAZ não foi capaz de retornar os limiares de retirada da pata próximos ao do grupo SH-ÁGUA em nenhum tempo testado, mostrando que a quitosana apresenta atividade antinociceptiva, porém não é forte o suficiente para igualar aos limiares de retirada da pata dos animais *sham*.

Com base nestes resultados é possível inferir que a NP VAZ apresentou efeito antinociceptivo, devido à presença de quitosana, no entanto, o efeito antinociceptivo é pronunciado e prolongado na NP PG, uma vez que nesta formulação ocorre o sinergismo de efeito antinociceptivo da PG e da quitosana.

Gráfico 5 - Comparação entre as substâncias – animais operados e água *sham* – durante 72 h após a administração



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: Pregabalina: PG (10 mg/Kg, V.O.); ÁGUA: veículo da PG; NP: nanopartícula; NP PG: nanopartícula polimérica contendo PG (10 mg PG/Kg, V.O.); NP VAZ: nanopartícula sem PG (veículo da NP PG); CCI: constrição crônica do nervo ciático, SH: *sham*; MB: medida basal; ANTES: no 14º dia após a CCI, imediatamente antes da administração das substâncias; tempo experimental: 72 h após a administração das substâncias. Aplicou-se o teste de ANOVA de duas vias com medidas repetidas com pós-teste de Newman-Keuls para a comparação entre os diferentes grupos, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ quando comparado com o grupo CCI-PG, \$ $p < 0,05$, \$\$ $p < 0,01$, \$\$\$ $p < 0,001$ quando comparado com o grupo CCI-NP PG. Aplicou-se o teste de ANOVA de duas vias com pós-teste de Bonferroni para comparar os grupos CCI com o grupo SH-ÁGUA. ! $p < 0,05$, !! $p < 0,01$ e !!! $p < 0,001$. Cada ponto representa a média \pm erro padrão da média (\pm E.P.M.) de 6 animais.

A NP PG apresentou um efeito antialodínico prolongado (efeito até 48 horas), quando comparado com a PG (efeito até 8 horas). Este resultado corrobora com o estudo de Aydogan et al (2015) que diz que microesferas de PG prolongam o tempo de retirada da cauda dos animais, quando comparado com PG, mostrando que os sistemas de liberação modificada, como microesferas e nanopartículas são eficazes em prolongar a liberação do ativo.

Taksande e Umekar (2018) mostraram que microesfera de PG, administradas por via intranasal, apresentaram efeito anticonvulsivante maior do que a PG administrada por via periférica, sugerindo que formas farmacêuticas de

liberação modificada de PG são vantajosas quando comparada com o tratamento convencional.

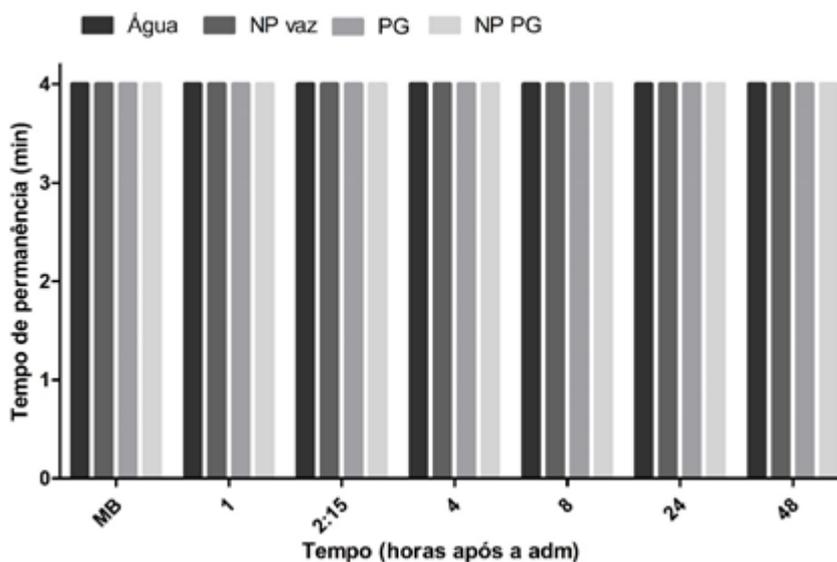
Como não foi observado efeito antinociceptivo após 72 h da administração das substâncias, os resultados estão sendo representados até este tempo de avaliação. No entanto, vale ressaltar que as avaliações foram feitas até 168 horas após a administração (7 dias) e nenhum dos animais que receberam NP VAZ ou NP PG morreram ou apresentaram sinais visuais de intoxicação, indicando que nessa dose e pelo tempo observado, a formulação não apresenta toxicidade aguda aparente, mas outros estudos são necessários para comprovar esse efeito de toxicidade aguda (OECD, 2002).

14.2 AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO MOTOR (TESTE DE ROTA-ROD)

O teste de rota-rod foi realizado de acordo com o item 13.4, com a finalidade de validar os resultados dos testes de avaliação do efeito antinociceptivo, verificando se as substâncias administradas afetam componentes motores do animal, por meio da sedação e/ou relaxamento muscular, segundo Dunham e Miya (1957). Vale ressaltar que a PG apresenta como um dos principais efeitos colaterais a sedação e a sonolência, conforme Dworkin *et al.*, 2007. Somado a isso, Boyce *et al.* (1999) relatam que os gabapentinoides podem reduzir a coordenação motora dos animais, mostrando que a avaliação da coordenação motora deve ser realizada.

Pelo Gráfico 6 foi possível observar que todos os animais foram capazes de manter o equilíbrio na barra giratória pelo período estabelecido e em todos os tempos testados, demonstrando que a administração das substâncias não ocasionou perda de coordenação motora nos animais, ou seja, as substâncias administradas não ocasionam déficit neurológico motor. Além disso, este resultado permite concluir que o efeito antinociceptivo encontrado pela PG, NP PG e NP VAZ (item 8.1) foi apenas sensorial e não motor.

Gráfico 6 - Avaliação do comportamento motor



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: Pregabalina: PG (10 mg/Kg, V.O.); ÁGUA: veículo da PG; NP: nanopartícula; NP PG: nanopartícula polimérica contendo PG (10 mg PG/Kg, V.O.); NP VAZ: nanopartícula sem PG (veículo da NP PG); MB: medida basal; tempo experimental: 48 horas. Aplicou-se o teste de ANOVA de duas vias com medidas repetidas com pós-teste de Newman-Keuls para comparação entre os diferentes grupos. Não foi observada nenhuma diferença significativa. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (\pm E.P.M.) de 6 animais.

O mesmo perfil de coordenação motora da PG foi observado por Pinedas-Faria *et al.* (2017) (dose de 30 mg/Kg) e por Khan *et al.* (2018) (dose de 10 mg/Kg), demonstrando que a PG não causa perda de coordenação motora nos animais.

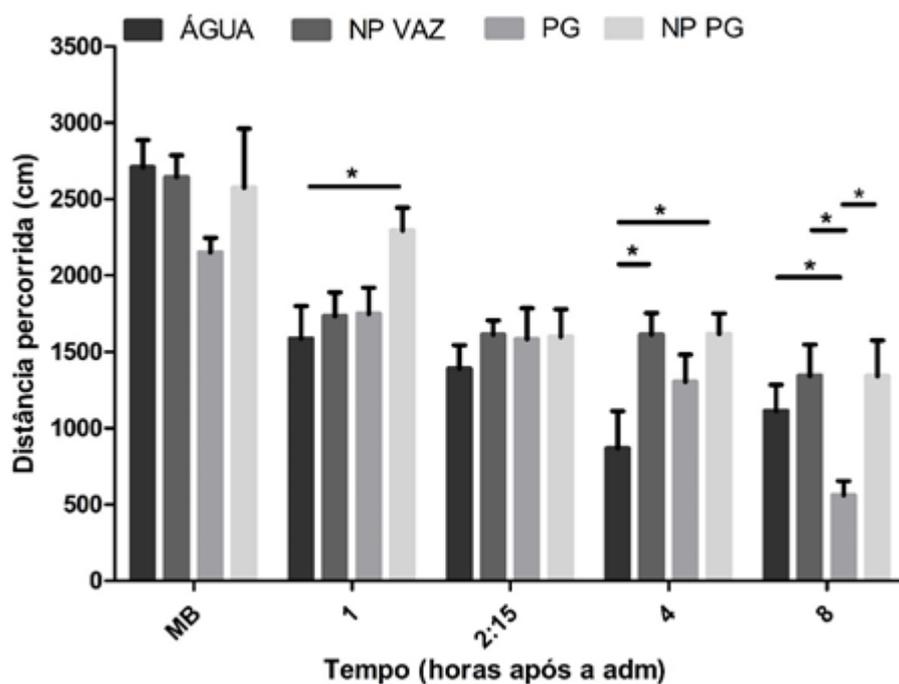
Como os animais não apresentaram o componente motor afetado após 48 h da administração das substâncias, julgou-se que não seria necessário continuar o teste após este período.

14.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LOCOMOTORA EM CAMPO ABERTO REDONDO

O teste de campo aberto foi realizado conforme descrito no item 13.5. Foram avaliados os seguintes parâmetros: distância percorrida no campo aberto, tempo de imobilidade e frequência de *rearing*, com a finalidade de avaliar a resposta da PG sobre o SNC do animal.

O Gráfico 7 mostra a distância percorrida pelos grupos nos diferentes tempos. Foi possível observar que no tempo de 1h, ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$) na distância percorrida no grupo NP PG quando comparado com o grupo ÁGUA. No tempo de 4h, ocorreu aumento significativo ($p < 0,05$) da distância percorrida quando se comparou o grupo NP VAZ e o grupo NP PG com o grupo ÁGUA. Já no tempo de 8h, ocorreu diminuição significativa ($p < 0,05$) da distância percorrida pelo grupo PG, quando comparado com os grupos ÁGUA, NP VAZ e NP PG. No entanto, essa redução significativa da distância percorrida pelo grupo PG, analisada isoladamente, parece ser um evento indeterminado, que não possibilita caracterizar um efeito depressor do SNC, já que pelo teste de rota-rod (item 14.2) os animais não apresentaram déficit motor no tempo de 8 horas. Além disso, o Gráfico 7 mostra que todos os grupos tiveram o mesmo perfil de redução do comportamento locomotor exploratório horizontal ao longo do tempo.

Gráfico 7 - Avaliação da distância percorrida no campo aberto

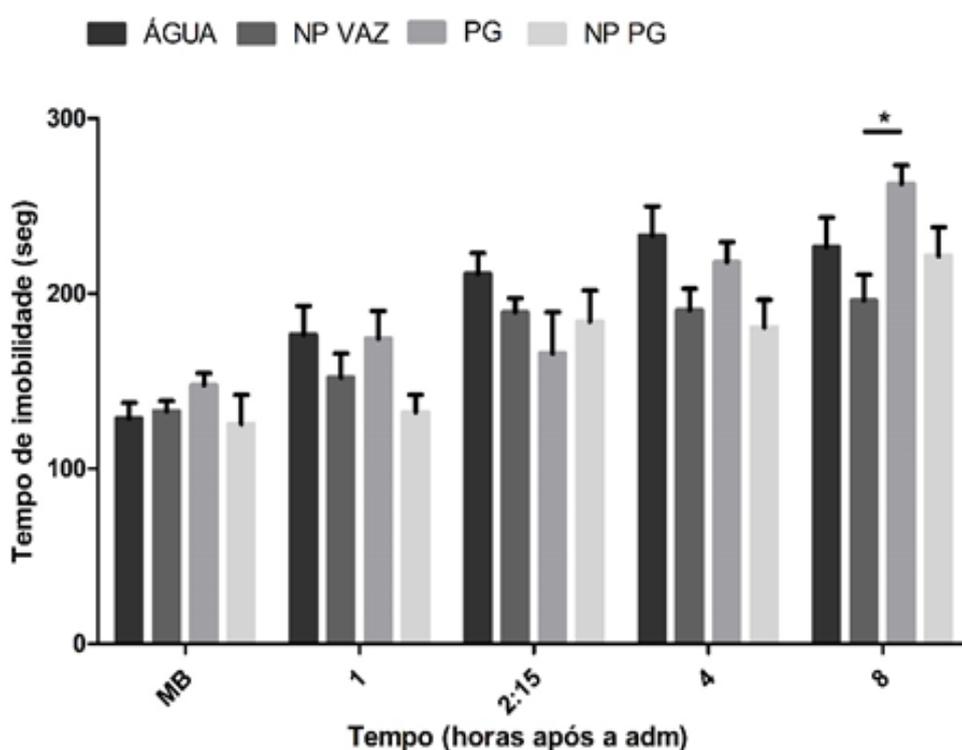


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: Pregabalina: PG (10 mg/Kg, V.O.); ÁGUA: veículo da PG; NP: nanopartícula; NP PG: nanopartícula polimérica contendo PG (10 mg PG/Kg, V.O.); NP VAZ: nanopartícula sem PG (veículo da NP PG); MB: medida basal; tempo experimental: 8 horas. Aplicou-se o teste de ANOVA de duas vias com medidas repetidas com pós-teste de Newman-Keuls para comparação entre os diferentes grupos. * $p < 0,05$. Houve diferença em 1h entre os grupos ÁGUA e NP PG; houveram diferenças em 4 h entre os grupos ÁGUA e NP VAZ e ÁGUA e NP PG; houveram diferenças em 8 h entre os grupos ÁGUA e PG, NP VAZ e PG e PG e NP PG. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (\pm E.P.M.) de 6 animais.

Pelo Gráfico 8 foi possível observar que quando diferentes grupos foram comparados, em diferentes tempos de avaliação, houve diferença significativa ($p < 0,05$) com relação ao tempo de imobilidade, quando se comparou os grupos NP VAZ e PG no tempo de 8h após a administração. Esse resultado não nos permite inferir nada sobre o efeito depressor da PG. Além disso, o Gráfico 8 mostra que todos os grupos apresentaram o mesmo perfil de aumento do tempo de imobilidade ao longo do tempo.

Gráfico 8 - Avaliação do tempo de imobilidade no campo aberto

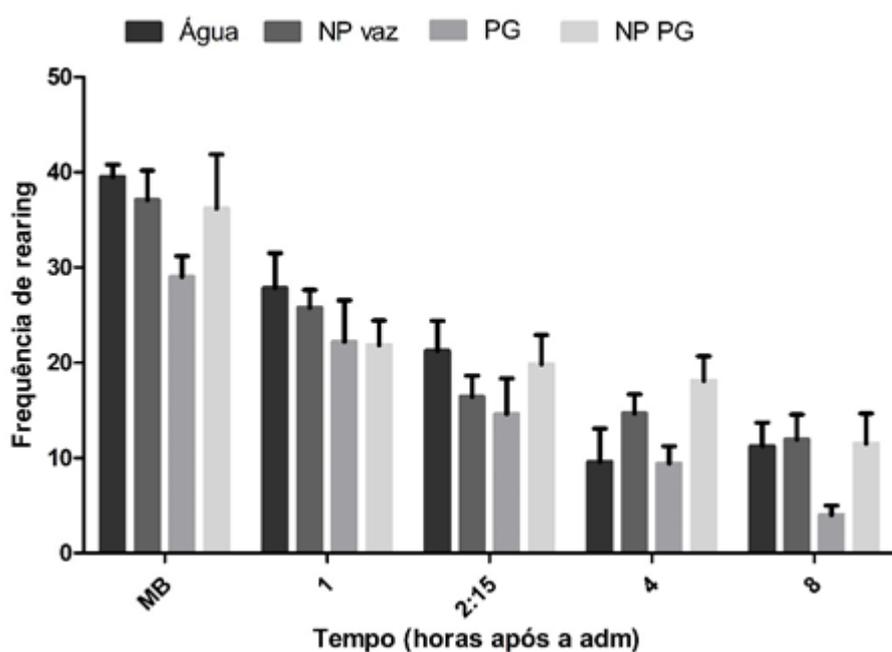


Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: Pregabalina: PG (10 mg/Kg, V.O.); ÁGUA: veículo da PG; NP: nanopartícula; NP PG: nanopartícula polimérica contendo PG (10 mg PG/Kg, V.O.); NP VAZ: nanopartícula sem PG (veículo da NP PG); MB: medida basal; tempo experimental: 8 horas. Aplicou-se o teste de ANOVA de duas vias com medidas repetidas com pós-teste de Newman-Keuls para comparação entre os diferentes grupos. * $p < 0,05$ quando se comparou os grupos NP VAZ e PG no tempo de 8h. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (\pm E.P.M.) de 6 animais.

Pelo Gráfico 9, foi possível observar que os diferentes grupos, nos tempos de avaliação, não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$) com relação ao *rearing*, mostrando que todos os grupos apresentaram o mesmo perfil de redução do comportamento exploratório vertical ao longo do tempo.

Gráfico 9 - Avaliação do movimento vertical (*rearing*) dos animais no campo aberto



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: Pregabalina: PG (10 mg/Kg, V.O.); ÁGUA: veículo da PG; NP: nanopartícula; NP PG: nanopartícula polimérica contendo PG (10 mg PG/Kg, V.O.); NP VAZ: nanopartícula sem PG (veículo da NP PG); MB: medida basal; tempo experimental: 8 horas. Aplicou-se o teste de ANOVA de duas vias com medidas repetidas com pós-teste de Newman-Keuls para comparação entre os diferentes grupos. Não foi observada nenhuma diferença significativa. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (\pm E.P.M.) de 6 animais.

Sabe-se que o comportamento locomotor possui relação direta com o SNC, uma vez que se a substância apresentar efeito depressor do SNC, o comportamento locomotor (horizontal e vertical) estará reduzido e o tempo de imobilidade estará aumentado. Esse efeito depressor do SNC foi observado por diversos autores, que testaram os efeitos centrais de extratos de plantas (CORREA *et al.*, 2003; MEDEIROS *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2008; REZVANI *et al.*, 2011). Dessa forma, foi possível observar no presente estudo, que os grupos tratados com NP VAZ, NP PG e PG pouco se diferenciam do grupo ÁGUA, ao longo do tempo, mostrando que por este estudo, não foi possível observar um comportamento depressor do SNC da PG e NP PG nos animais.

Além disso, era esperado que o grupo ÁGUA e o grupo NP VAZ apresentassem um perfil constante de exploração ao longo do tempo e que esse perfil demonstrasse uma atividade normal do SNC, já que essas substâncias não possuem efeito depressor do SNC. Também era esperado que a PG apresentasse um comportamento exploratório reduzido após a sua administração, já que a PG apresenta efeitos depressores do SNC e que esse comportamento não fosse evidenciado ou fosse reduzido na NP PG, já que a utilização de nanocarreador possibilita redução de efeitos colaterais. No entanto, não foi possível observar esse efeito depressor da PG, nem na forma de solução e nem na forma de nanopartícula, uma vez que os animais ficaram sob situação de estresse durante todo o período de experimentação, por todos os animais serem submetidos a testes consecutivos de campo aberto e de rota-rod, totalizando 5 repetições em cada teste. Pelo mesmo motivo, não foi possível observar o perfil de atividade do SNC nos grupos ÁGUA e NP VAZ.

Essa situação de reexposição aos testes ocorreu para que os princípios dos 3R's (substituição, redução e refinamento) na ética de uso de animais fosse respeitada, já que para verificar o efeito depressor do SNC mais detalhadamente, seria melhor a observação de um grupo (n=6) para cada substância, que fosse testado em apenas 1 tempo de avaliação, além de ser testado em um tipo de teste de cada vez, o que demandaria um total de 120 animais para o teste de campo aberto e 24 animais para o teste de rota-rod, além do tempo de experimentação prolongado.

De acordo com Berlyne (1950), os ratos tendem a desempenhar um comportamento exploratório quando expostos a ambientes não familiares, provocados pela novidade. Para explorar, o animal necessita locomover-se horizontalmente e verticalmente (erguendo-se sob as patas traseiras), conforme Birke e Archer (1983). No entanto, quando os animais são reexpostos ao ambiente, o comportamento exploratório tende a diminuir, já que os animais possuem capacidade de memória emocional, que consiste na capacidade de modular o seu comportamento de acordo com experiências prévias, segundo Archer (1973) e Xavier (1993). Estas observações estão presentes neste estudo, já que ao serem reexpostos ao teste, os animais apresentaram perfil de redução da exploração horizontal, representada pela distância percorrida, apresentaram também perfil de redução da exploração vertical, representada pela frequência de *rearing*, além de apresentarem aumento no perfil de imobilidade, que tem relação indireta com a exploração horizontal.

Sendo assim, pelo teste de campo aberto só foi possível observar que os animais apresentaram um comportamento normal de redução de exploração do ambiente à medida que os animais foram reexpostos ao ambiente. No entanto, não foi possível observar o efeito depressor do SNC da PG que era desejado.

14.4 AVALIAÇÃO DO SONO INDUZIDO POR BARBITÚRICOS

O teste da avaliação do sono induzido por barbitúricos foi realizado como descrito no item 13.6, para a verificação da ação depressora central da PG em solução e nanoencapsulada, principalmente analisando a sedação e a sonolência como principal efeito colateral deste fármaco.

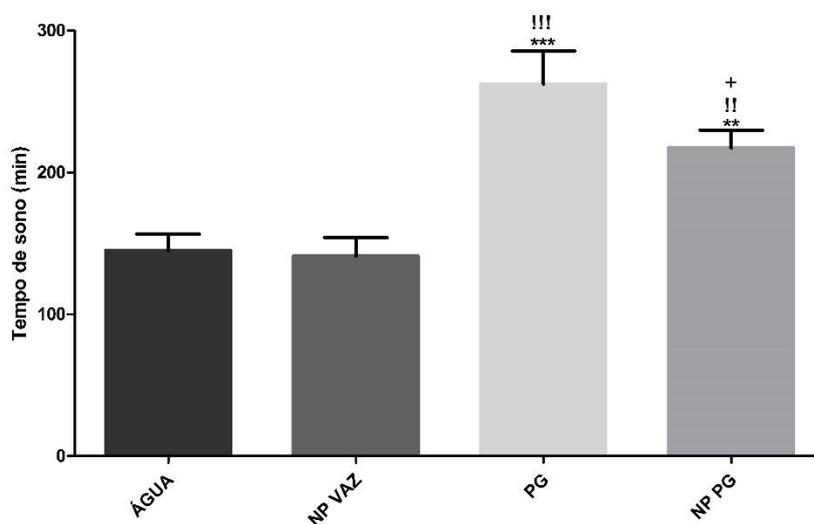
Pelo Gráfico 10 é possível observar que os grupos ÁGUA e NP VAZ apresentaram o mesmo tempo de sono, por não haver diferença significativa, mostrando que os componentes da NP VAZ não demonstram ação depressora do SNC, de forma inespecífica. Além disso, foi possível observar que quando comparado com o grupo ÁGUA, os grupos PG e NP PG apresentaram aumento significativo no tempo de sono ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente), demonstrando que ambas substâncias possuem ação depressora do SNC, já que o sono induzido

por barbitúrico foi potencializado em 1,81 e 1,50 vezes, respectivamente. Este dado é condizente com o princípio do teste, que diz que substâncias com ação depressora do SNC, em geral, reduzem a latência e/ou aumentam a duração do sono induzido por um barbitúrico (MEDEIROS *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2008; RILEY; SPINKS, 1958) e a PG é conhecidamente um depressor do SNC, causando sonolência em pacientes (DWORKIN *et al.*, 2007).

Ainda, foi possível observar que quando comparado com o grupo NP VAZ, houve aumento significativo no tempo de sono nos grupos PG e NP PG ($p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente), demonstrando que além de a PG e a NP PG serem depressoras do SNC, a ação depressora ocorre somente devido à PG, já que a NP VAZ apresenta o mesmo tempo de sono que a ÁGUA, o que se correlaciona com dados da literatura, que relatam a PG causando sonolência como efeito colateral (DWORKIN *et al.*, 2007).

O achado mais importante deste teste foi a redução em 0,83 vezes do tempo de sono do grupo NP PG quando comparado com o grupo PG ($p < 0,05$), o que demonstra que quando a PG é veiculada em um nanocarreador, o seu principal efeito colateral, que é a sonolência, é reduzido, corroborando relatos de Arachchige, Reshetnyak e Andreev (2015), atingindo o objetivo proposto. No entanto, acredita-se que a redução do tempo de sono não foi maior no grupo NP PG quando comparado com o grupo PG, pelo fato de ter fármaco livre na formulação, já que a taxa de associação do fármaco foi de aproximadamente 44% (item 6.2.2).

Gráfico 10 - Avaliação do tempo de sono induzido por barbitúrico



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: Pregabalina: PG (10 mg/Kg, V.O.); ÁGUA: veículo da PG; NP: nanopartícula; NP PG: nanopartícula polimérica contendo PG (10 mg PG/Kg, V.O.); NP VAZ: nanopartícula sem PG (veículo da NP PG). Administração de tiopental (40 mg/Kg, I.P.) 1h após a administração das substâncias para indução do sono. Aplicou-se o teste de ANOVA de uma via com pós-teste de Newman-Keuls para a comparação dos diferentes grupos, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo ÁGUA; !! $p < 0,01$ e !!! $p < 0,001$ quando comparado com o grupo NP VAZ; + $p < 0,05$ quando comparado com o grupo PG. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média (\pm E.P.M.) de 12 animais.

15 CONCLUSÃO PARCIAL

- a) A avaliação da antinocicepção mostrou que a NP PG apresentou um perfil prolongado de ação, com efeito de até 48 horas após a administração da substância, quando comparado com PG em solução, que apresentou efeito até 8h após a administração da substância;
- b) A NP VAZ também apresentou efeito antinociceptivo, em decorrência da QS utilizados na formulação, que possui propriedades analgésicas;
- c) A avaliação da antinocicepção da NP PG apresentou efeito prolongado, mas também um efeito sinérgico da PG com a QS utilizadas no nanocarreador, já que esse polímero também apresenta ação analgésica, mostrando que a quitosana pode ser um bom biopolímero para novas formas farmacêuticas para o tratamento da dor neuropática;
- d) Nenhuma das substâncias ocasionou déficit motor em nenhum dos tempos testados, analisado pelo teste de rota-rod;
- e) Os parâmetros de distância percorrida, tempo de imobilidade e *rearing* avaliados no campo aberto mostraram que os animais apresentaram um perfil de desinteresse de exploração frente à reexposição ao teste, independente da substância administrada;
- f) Pelo teste de campo aberto, não foi possível observar o efeito depressor do SNC pela PG ou NP PG;
- g) A PG em solução e a NP PG apresentaram efeito sedativo, quando comparado com a ÁGUA e NP VAZ, no entanto, a NP PG apresentou redução do tempo de sono, quando comparada com a PG, indicando que a NP PG reduziu a intensidade da sonolência como efeito colateral.

16 CONCLUSÃO FINAL

No presente estudo, nanopartículas poliméricas, de origem natural, contendo PG foram formulados para a administração oral, com o intuito de reduzir a frequência de administrações e reduzir os efeitos colaterais da PG.

Investigações físico-químicas demonstraram que os nanocompósitos apresentaram características favoráveis para liberação sustentada de PG e seriam uma boa opção para as avaliações *in vivo*. As características farmacocinéticas da formulação *in vivo* demonstraram que esta é uma formulação de circulação estendida, sendo vantajosa para a obtenção de um perfil prolongado de ação. Os estudos em animais demonstraram que a NP PG prolongou o efeito antialodínico da PG em solução, se mostrando eficaz, além de apresentar um perfil vantajoso com relação à redução da sonolência, principal efeito colateral do fármaco.

Sendo assim, a administração oral de PG através de nanopartículas poliméricas de origem natural, com características favoráveis ao tratamento desta patologia, representa avanços potenciais para administração aprimorada de PG para o tratamento de dor neuropática, podendo favorecer a adesão ao tratamento e o bem-estar dos pacientes, quando for estendida para a prática clínica, já que permite uma redução na frequência da administração, com efeitos colaterais reduzidos, proporcionando um tratamento mais conveniente para os pacientes.

Além disso, outro benefício obtido por este trabalho foi o desenvolvimento e validação de dois métodos analíticos, para a determinação de pregabalina em plasma e em solvente, possibilitando que esses métodos sirvam de guia para que outros profissionais possam fazer a quantificação de pregabalina, já que nos compêndios oficiais mais usados (Farmacopeia Americana, Farmacopeia Europeia, Farmacopeia Brasileira, entre outros) não existe uma monografia para pregabalina, que é uma substância considerada como droga de abuso e deve ser quantificada em alguns casos.

No entanto, uma das limitações encontradas no presente estudo está relacionada com a estabilidade da formulação, uma vez que a formulação não é estável em meio aquoso e não redispersa após a liofilização, sendo necessário, neste estudo, o preparo da formulação imediatamente antes da sua administração. Além disso, a determinação da taxa de associação de PG à nanopartícula foi

complicada de ser realizada, pela presença dos mesmos grupos funcionais na PG e na QS e a dificuldade de separação entre estes dois compostos.

Dessa forma, para que essa formulação seja encaminhada para estudos clínicos, novos esforços devem ser realizados com o intuito de obtenção de uma formulação estável e que seja de fácil administração para os pacientes. Além disso, novos estudos precisam ser realizados para a transferência dessa tecnologia de geleificação ionotrópica por gotejamento para produção em larga escala, já que a técnica utilizada neste trabalho foi bastante manual. Somado a isso, essa formulação desenvolvida precisa ser testada em outros modelos animais que mimetizem etiologias diferentes de dor neuropática, e em outros grupos populacionais de animais, com a finalidade de verificar a ocorrência de efeito benéfico em outros tipos de dor neuropática e se esse efeito é modificado com as modificações populacionais, como gênero, raça, idade. Ainda, testes de toxicidade da formulação devem ser realizados em animais, antes da transferência para estudos clínicos.

Diante do exposto, algumas dificuldades foram enfrentadas para que este trabalho fosse executado, mas, apesar das dificuldades, foi um trabalho muito gratificante de ser realizado e que trouxe uma série de aprendizados pessoais, além do alento de saber que este trabalho poderá contribuir para o avanço científico e para a recuperação da saúde dos pacientes acometidos com dor neuropática.

REFERÊNCIAS

- ALBADARIN, A.B. *et al.* Development of stability-enhanced ternary solid dispersions via combinations of HPMCP and Soluplus[®] processed by hot melt extrusion. **International Journal of Pharmaceutics**, Ireland, v.532, n.1, p.603-611, 2017.
- ALMEIDA, R. N. *et al.* Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, Brasil, v.80, p.72-76, 1999.
- ANDERSON, V. *et al.* Benefits of using the brief pain inventory in patients with cancer pain: an intervention study conducted in Swedish hospitals. **Support Care Cancer**, Sweden, p.1-9, 2019.
- APOLINÁRIO, A.C. *et al.* Abrindo a caixa de pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais 'espaço lá embaixo'. **Química Nova**, São Paulo, Brasil, v.43, n.2, p.212-225, 2020.
- AQUINO JÚNIOR, M.K. **Efeitos do hipotireoidismo induzido experimentalmente no comportamento depressivo e na farmacocinética da venlafaxina em ratos Wistar adultos**. 2019. 80f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2019.
- ARACHCHIGE, M. C.M.; RESHETNYAK, Y. K.; ANDREEV, O. A. Advanced targeted nanomedicine. **J. Biotechnology**, Kingston, RI, USA, v. 202, p. 88–97, 2015.
- ARAFI, M.G.; AYOUB, B.M. DOE optimization of nano-based carrier of pregabalin as hydrogel: new therapeutic & chemometric approaches for controlled drug delivery systems. **Scientific reports**, Cairo, Egypt, v. 7, n. 1, 2017.
- ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior**, Brighton, Sussex, England, v.21, p. 205-235, 1973.
- AUSTIN, P.J.; WU, A.; MOALEM-TAYLOR, G. Chronic Constriction of the sciatic nerve and pain hypersensitivity testing in rats. **Journal of Visualized Experiments**, Sidney, Australia, v. 61, 2012.
- AYDOĞAN, E. *et al.* Process and formulation variables of pregabalin microspheres prepared by w/o/o double emulsion solvent diffusion method and their clinical application by animal modeling studies. **Drug Dev Ind Pharm**, Tandogan, Ankara , Turkey, v. 41, n. 8, p.1311-1320, 2015.
- AYDOĞAN, H. *et al.* Adição de 75 mg de PG ao regime analgésico reduz escores de dor e consumo de opiáceos em adultos após nefrolitotomia percutânea. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Sanliurfa, Turquia, 2014.

BARBI, M. S. *et al.* Preparation and characterization of chitosan nanoparticles for AZT Nasal Delivery. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Araraquara, São Paulo, Brazil, v. 14, p. 1–10, 2014.

BARBOSA, J.A.C. *et al.* Achieving gastroresistance without coating: formulation of capsule shells from enteric polymers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Huddersfield, United Kingdom, v. 144, p. 174-179, 2019.

BEE, L.A.; DICKENSON, A.H. Descending facilitation from the brainstem determines behavioral and neuronal hypersensitivity following nerve injury and efficacy of pregabalin. **Pain**, London, United Kingdom, v.140, p. 209– 223, 2008.

BELLORIO, K.B. *et al.* Estudo de bioequivalência entre duas formulações de pregabalina 150 mg cápsulas em voluntários sadios. **Revista Brasileira de Medicina**, Goiânia, Brasil, v.71, n. 6/7, p.188-192, 2014.

BEN-MENACHEM, E. Pregabalin pharmacology and its relevance to clinical practice. **Epilepsia**, Göteborg, Sweden, n.45, v. 6, p.13-18, 2004.

BENNET, G.J.; XIE, Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, Bethesda, U.S.A., v.33, p.87-107, 1988.

BERLYNE, D. E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior. **British Journal of Psychology**, St. Andrews, United Kingdom, v.41, p. 68-80, 1950.

BERSCH, P. C.; NIES, B.; LIEBENDORFER, A.; J. Evaluation of the biological properties of different wound dressing materials. **Mater. Sci. Mater. Med.**, Shiraz, Iran, v.6, p. 231-240,1995.

BESSION, J.M. The neurobiology of pain. **Lancet**, Paris, France, v.353, p.1610-1615, 1999.

BHUMKAR, D.; POKHARKAR, V. Studies on effect of pH on cross-linking of chitosan with sodium tripolyphosphate: A technical note. **AAPS Pharm SciTech**, Pune, Maharashtra State, India, v. 7, n. 2, p. E138-E143, 2006.

BIRKE, L.I.A.; ARCHER, J. Some issues and problems in the study of animal exploration. **Exploration in animals and humans**. Cambridge: University press, p. 279, 1983.

BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: mecanismos e aplicação. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, São Paulo, Brasil, v.3, n.2, p. 1-12, 2016.

BOCKBRADER, H. *et al.* A comparison of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of pregabalin and gabapentin. **Clinical Pharmacokinetics**, Michigan, USA., v. 49, p. 661–669, 2010.

BOCKBRADER, H.N. *et al.* Population pharmacokinetics of pregabalin in healthy subjects and patients with chronic pain or partial seizures. **Epilepsia**, New London, Connecticut, USA., v.52, n.2, p.248-257, 2011.

BOROUJERDI, M. Noncompartmental approach in pharmacokinetics based on statistical moments. **Pharmacokinetics: Principles and applications**. New York: Mc Graw-Hill, cap. 17, p. 331-341, 2002.

BOYCE, S. *et al.* Selective NMDA NR2B antagonists induce antinociception without motor dysfunction: correlation with restricted localization of NR2B subunit in dorsal horn. **Neuropharmacology**, Harlow, United Kingdom, v.38, p. 611–623, 1999.

BOYLE, J. *et al.* Randomized, placebo-controlled comparison of amitriptyline, duloxetine, and pregabalin in patients with chronic diabetic peripheral neuropathic pain: impact on pain, polysomnographic sleep, daytime functioning, and quality of life. **Diabetes care**, Guildford, Surrey, United Kingdom, v. 35, n. 12, p. 2451-2458, 2012.

BRANDÃO JÚNIOR, P.M.C; BESSET, V.L. Dor crônica: um problema de saúde pública, uma questão para a psicanálise. **Polêmica**, Rio de Janeiro, Brasil, v.15, n.3, p. 25-41, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopeia Brasileira**, v. 1, 6. ed., p. 76-80. Brasília, DF, 2019. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia/farmacopeia-brasileira/arquivos/7985json-file-1>. Acesso em: 12 jan. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 166, de 25 de Julho de 2017**. Brasília, DF, Brasil. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401. Acesso em: 12 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução nº 27, de 17 de maio de 2012** (2012a). Brasília, DF, Brasil. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2012/rdc0027_17_05_2012.html. Acesso em: 13 jul.2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Cuidados paliativos oncológicos: controle da dor**. - Rio de Janeiro, Brasil: INCA, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria nº 1083, de 02 de outubro de 2012** (2012b). Brasília, DF, Brasil. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/pcdt-dor-cronica-2012.pdf>. Acesso em: 15 jun. 2018.

BRAWEK, B. *et al.* Effects of gabapentin and pregabalin on K⁺-evoked 3H-GABA and 3 H-glutamate release from human neocortical synaptosomes. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Freiburg, Germany, v.379, p. 361–369, 2009.

BRENZA, T.M. *et al.* Neuronal protection against oxidative insult by polyanhydride nanoparticle-based mitochondria-targeted antioxidant therapy. **Nanomedicine**, Ames, IA, USA, v.13, n.3, p.809-820, 2017.

BUOLI, M.; CALDIROLI, A.; SERATI, M. Pharmacokinetic evaluation of pregabalin for the treatment of generalized anxiety disorder. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, Milan, Italy, v.13, n.3, p. 351- 359, 2017.

CALVO, P.*et al.* Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, Hoboken, USA, v. 63, p. 125-132, 1997.

CAMARGO, P.H.C.; SATYANARAYANA, K.G.; WYPYCH, F. Nanocomposites: synthesis, structure, properties and new application opportunities. **Material Research**, Curitiba, Paraná, Brazil, v.12, n.1, 2009.

CARLINI, E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. **Rev. Ass. Bras. Psiquiatria**, Brasil, v.1, p.25-31, 1979.

CARVALHO, R.C. *et al.* Prevalence and characteristics of chronic pain in Brazil: a national internet-based survey study. **Brazilian Journal of Pain**, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, v.4, n.1, p. 331-338, 2018.

CASTANE, A. *et al.* Development and expression of neuropathic pain in CB1 knockout mice. **Neuropharmacology**, Barcelona, Spain, v.50, p.111-122, 2006.

CAVALLI, E. *et al.* The neuropathic pain: an overview of the current treatment and future therapeutic approaches. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, Italy, v. 33, p. 1-10, 2019.

CENTRO DE BIOTERISMO DA UNIFAL-MG. **Manual de anestesia e analgesia do biotério da UNIFAL-MG**, 2018. Alfenas, Minas Gerais, Brasil. Disponível em: <https://www.unifal-mg.edu.br/cebio/wp-content/uploads/sites/45/2018/06/Anestesia-e-Analgesia.pdf>. Acesso em: 03 jan. 2020.

CEVIK, O.; GIDAN, D.; KIZILEL, S. Visible-light-induced synthesis of pH-responsive composite hydrogels for controlled delivery of the anticonvulsant drug pregabalin. **Acta Biomaterials**, Istanbul, Turkey, v.11, p. 151-161, 2015.

CHAPLAN, S. R. *et al.* Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. **J Neurosci Methods**, California, San Diego, USA, v. 53, p. 55-63, 1994.

CHEW, M.L. *et al.* Pharmacokinetics of pregabalin controlled-release in healthy volunteers: effect of food in five single-dose, randomized, clinical pharmacology studies. **Clinical Drug Investigation**, Groton, USA, v.34, n.9, p. 617-626, 2014.

CINAY, G.E. *et al.* Nanogel-integrated pH responsive composite hydrogels for controlled drug delivery. **ACS Biomater Sci Eng**, Istanbul, Turkey, v. 3, n. 3, p. 370-380, 2017.

CODERRE, T.J. *et al.* Evidence that gabapentin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. **J Neurochem**, Montreal, Canada, v.94, p.1131-1139, 2005.

COHEN, S.P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **British Medical Journal**, Baltimore, USA, v.348, n.f7656, 2014.

CORREA, M. *et al.* Open field locomotor effects in rats after intraventricular injections of ethanol and the ethanol metabolites acetaldehyde and acetate. **Brain Research Bulletin**, Storrs, USA, v. 62, n. 3, p. 197-202, 2003.

COUVREUR, P. *et al.* Nanocapsule technology: a review. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, Chatenay-Malabry, France, v.19, n.2, p.99-134, 2002.

CUI, Z. *et al.* Ionic interactions between sulfuric acid and chitosan membranes. **Carbohyd. Polym.**, Beijing, China, v. 73, n.1, p.111-116, 2008.

DAMGÉ, C.; REIS, C.P.; MAINCENT, P. Nanoparticle strategies for the oral delivery of insulin. **Expert Opinion Drug Delivery**, Strasbourg, France, v.5, n.1, p.45-68, 2008.

DAVIES, A. *et al.* Functional biology of the alpha (2) delta subunits of voltage-gated calcium channels. **Trends Pharmacological Science**, London, United Kingdom, v. 28, 2007.

DAVIS, K.D.; MOAYEDI, M. Central mechanisms of pain revealed through functional and structural MRI. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, Toronto, Ontario, Canada, v. 8, p. 518-534, 2013.

de PAIVA, V.N. *et al.* Prostaglandins mediate depressive-like behavior induced by endotoxin in mice. **Behavioral Brain Research**, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, v. 215, p. 146-151, 2010.

DERRY, S. *et al.* Pregabalin for neuropathic pain in adults. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, Oxford, United Kingdom, v.1, 2019.

DETLOF, M. R. *et al.* Validity of acute and chronic tactile sensory testing after spinal cord injury in rats. **Experimental Neurology**, Columbus, OH, USA, v. 225, n.2, p. 366-376, 2010.

DING, L. *et al.* The antiallodynic action of pregabalin may depend on the suppression of spinal neuronal hyperexcitability in rats with spared nerve injury. **Pain Res Manag**, Beijing, China, v.19, p.205-211, 2014.

DiPIERRO, F.; SETTEMBRE, R. Safety and efficacy of an add-on therapy with curcumin phytosome and piperine and/or lipoic acid in subjects with a diagnosis of peripheral neuropathy treated with dexibuprofen. **Journal of Pain Research**, Milan, Italy, v.6, p. 457-503, 2013.

DiPIRO, J.T. *et al.* **Concepts in clinical pharmacokinetics**. 4. ed. Bethesda: American Society of Health-System Pharmacists, 2005.

DIXON, W. J. Experimental Observations. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, Los Angeles, California, USA, v. 20, p. 441–462, 1980.

DOWDALL, T.; ROBINSON, I.; MEERT, T. Comparison of five different rat models of peripheral nerve injury. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Beerse, Belgium, v.80, n.1, p. 93–108, 2005.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, Nebraska, Lincoln, USA, v. 46, n.3, p.208-209, 1957.

DÚRAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. **Nanotecnologia**: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber Editora, 2006.

DWORKIN, R.H. *et al.* Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain**, Madison, WI, USA, v.132, p.237-251, 2007.

ECHTERHOFF, R.R. **A eficácia da pregabalina no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada**. 2012. 24f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Psiquiatria) – Departamento de Psiquiatria e Medicina Forense, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

EHRICH, W.; HÖH, H.; KREINER, C. Biocompatibility and pharmacokinetics of hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) in the anterior chamber of the rabbit eye. **Klinische Monatsblätter Augenheilkd**, Homburg/Saar, v.196, p.470–474, 1990.

EINARSDOTTIR, S.; BJORNSSON, E. Pregabalin as a probable cause of acute liver injury. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, Gothenburg, Sweden, v. 20, p.1049, 2008.

FAN, W. *et al.* Formation mechanism of nanodisperse low molecular weight chitosan nanoparticles by ionic gelation technique. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Wuhan, China, v. 90, p. 21-27, 2012.

FAROKHZAD, O.C.; LANGER, R. Impact of nanotechnology on drug delivery. **ACS Nano**, Boston, Massachusetts, USA, v.3, n.1, p. 16-20, 2009.

FEHRENBACHER, J.C.; TAYLOR, C.P.; VASKO, M.R. Pregabalin and gabapentin reduce release of substance P and CGRP from rat spinal tissues only after inflammation or activation of protein kinase C. **Pain**, Indianapolis, USA, v.105, p.133-41, 2003.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CORREA, F.M. Central and peripheral antialgesic action of aspirin-like drugs. **European Journal of Pharmacology**, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, v.53, p. 39-48, 1978.

FERREIRA, V.F.; ROCHA, D.R. Potencialidades e oportunidades na química da sacarose e outros açúcares. **Química Nova**, Rio de Janeiro, Brasil, v.32, n.3, p. 623-638, 2009.

FIELD, M. *et al.* Pregabalin may represent a novel class of anxiolytic agents with a broad spectrum of activity. **British Journal of Pharmacology**, Cambridge, United Kingdom, v.132, p. 1–4, 2001.

FIELD, M.J. *et al.* Gabapentin and pregabalin, but not morphine and amitriptyline, block both static and dynamic components of mechanical allodynia induced by streptozotocin in the rat. **Pain**, Cambridge, United Kingdom, v.80, p.391–398, 1999.

FINNERUP, N.B. *et al.* Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Neurology**, Aarhus, Denmark, v. 14, n. 2, p. 162-173, 2015.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Approval of Lyrica® (pregabalin)**. 2004. Maryland, USA. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2004/021446_Lyrica%20Capsules_approv.PDF. Acesso em: 01 fev. 2021.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). **Approval of Lyrica CR® (pregabalin)**. 2017. Maryland, USA. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2017/209501Orig1s000Approval.pdf. Acesso em: 01 fev. 2021.

FRAMPTON, J.E. Pregabalin: a review of its use in adults with generalized anxiety disorder. **CNS Drugs**, Auckland, New Zealand, v.28, n.9, p.835-854, 2014.

FREYHNHAGEN, R. *et al.* Current understanding of the mixed pain concept: a brief narrative review. **Current Medical Research and Opinion**, Tutzing, Germany, v.35, n.6, p.1011-1018, 2019.

FUKASAWA, H. *et al.* Transdermal administration of aqueous pregabalin solution as a potential treatment option for patients with neuropathic pain to avoid central nervous system-mediated side effects. **Biol. Pharm. Bull.**, Japan, v. 37, n.11, p.1816-1819, 2014.

GABAY, E.; TAL, M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. **Pain**, Jerusalem, Israel, v.110, p. 354-360, 2004.

GAJRAJ, N. Pregabalin: its pharmacology and use in pain management. **Anesthesia & Analgesia Journal**, Texas, USA, v. 105, p. 1805–1815, 2007.

GEREAU, R.W. *et al.* A pain research agenda for the 21st century. **The Journal of Pain**, St. Louis, Missouri, USA, v.15, n.12, p.1203-1214, 2014.

GHUMMAN, S. *et al.* Taro-corns mucilage-alginate microspheres for the sustained release of pregabalin: *in vitro* & *in vivo* evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, Sargodha, Pakistan, v. 139, p. 1191-1202, 2019.

GIBBS, K. *et al.* Assessment of pain symptoms and quality of life using the International Spinal Cord Injury Data Sets in person with chronic spinal cord injury. **Spinal Cord Series and Cases**, New York, USA, v.5, n.32, 2019.

GODFREY, L. *et al.* Nanoparticulate peptide delivery exclusively to the brain produces tolerance free analgesia. **Journal of Controlled Release**, London, United Kingdom, v.270, p. 135-144, 2018.

GOLD, M.S.; GEBHART, G.F. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. Focus in pain. **Nature Medicine**, Pittsburgh, Pennsylvania, USA, v.16, p. 248-1257, 2010.

GONSALVES, A.A. *et al.* Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, Petrolina, Brasil, v. 34, n. 7, p. 1215-1223, 2011.

GRAVA, A.L.S. *et al.* Tratamento farmacológico da hiperalgesia experimental induzida pelo núcleo pulposo. **Revista Brasileira de Ortopedia**, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil, v.45, n.6, p. 569-576, 2010.

GUARINO, V. *et al.* Electrospun polycaprolactone nanofibers decorated by drug loaded chitosan nano-reservoirs for antibacterial treatments. **Nanotechnology**, Naples, Italy, v.28, n.50, 2017.

HADY, W.E.A.E. *et al.* *In vitro-in vivo* evaluation of chitosan-PLGA nanoparticles for potentiated gastric retention and anti-ulcer activity of diosmin. **International Journal of Nanomedicine**, Mansoura, Egypt, v. 14, p. 7191-7213, 2019.

HALL, C. S. Emotional behavior in the rat 1. Defecation and urination as measures of individual differences in emotionality. **Journal of Comparative Psychology**, Washington, v.18, p.385-403, 1934.

HARGREAVES, K. *et al.* A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. **Pain**, Bethesda, U.S.A, v.32, n.1, p. 77-88, 1988.

HARIKRISHNAN, S.; BHOOPATHY, T.J. Experimental and theoretical investigation and NBO analysis on the structure of pregabalin. **Chemical Science Transactions**, Tamilnadu, India, v.3, n.2, p. 624-633, 2014.

HARMS, P. G; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **Journal of Applied Physiology**, Dallas, Texas, USA, v. 36, n.3, p.391-392, 1974.

HSIEN, T-Y.; RORRER, G. L. Heterogeneous cross-linking of chitosan gel beads: kinetics, modeling, and influence on cadmium ion adsorption capacity. **Ind. Eng. Chem. Res.**, Corvallis, Oregon, USA, v.36, n.9, p.3631-3638, 1997.

HUANG, S. *et al.* Analgesics and wound healing effect of chitosan and carboxymethyl chitosan on scalded rats. **Journal of Ocean University of China**, Qingdao, China, v.13, p. 837-841, 2014.

HUANG, W. *et al.* On-demand dissolvable self-healing hydrogel based on carboxymethyl chitosan and cellulose nanocrystal for deep partial thickness burn wound healing. **ACS Applied Materials & Interfaces**, Alberta, Canada, v. 10, n.48, p. 41076-41088, 2018.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, Bergen, Norway, v.30, p.103-114, 1987.

IBRAHIM, M.M. *et al.* Once daily pregabalin eye drops for management of glaucoma. **ASC Nano**, Memphis, Tennessee, United States, v. 13, n. 2, p.13728-13744, 2019.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (IASP). **IASP Terminology**. 2020. Washington, USA. Disponível em: <https://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698>. Acesso em: 14 abr. 2021.

ITALIANO, D.; PERUCCA, E. Clinical pharmacokinetics of new-generation antiepileptic drugs at the extremes of age: an update. **Clinical Pharmacokinetics**, Messina, Italy, v.52, n.8, p.627-645, 2013.

JAGGI, A.S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, Patiala, India, v. 25, p. 1-28, 2011.

JAIMES-AGUIRRE, L. *et al.* Biodegradable poly(D,L-lactide-co glycolide)/poly(L-γ-glutamic acid) nanoparticles conjugated to folic acid for targeted delivery of doxorubicin. **Materials Science and Engineering C Materials for Biological Application**, Toluca, Mexico, v. 76, p.743-751, 2017.

JANG, Y. *et al.* The immunomodulatory effect of pregabalin on spleen cells in neuropathic mice. **Anesth Analg**, Seoul, South Korea, v.115, p.830-836, 2012.

JENSEN, K. *et al.* Pressure-pain threshold in human temporal region: evaluation of a new pressure algometer. **Pain**, Copenhagen, Denmark, v.25, p.313-323, 1986.

JEONG, K. H. *et al.* Formulation of a modified-release pregabalin tablet using hot-melt coating with glyceryl behenate. **International Journal of Pharmaceutics**, Seoul, Republic of Korea, v.495, n.1, p. 1–8, 2015.

JIMÉNEZ, A. *et al.* Effect of lipid self-association on the microstructure and physical properties of hydroxypropyl-methylcellulose edible films containing fatty acids. **Carbohydrate Polymers**, Valencia, Spain, v.82, p.585–593, 2010.

KAMBLE, S.V. *et al.* Low doses of amitriptyline, pregabalin, and gabapentin are preferred for management of neuropathic pain in India: is there a need for revisiting dosing recommendation? **The Korean Journal of Pain**, Mumbai, India, v. 30, n. 3, p.183-191, 2017.

KANWAR, N. *et al.* Preparation and evaluation of floating tablets of pregabalin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, Chandigarh, India, v. 42, n. 4, p. 654-660, 2016.

KHAFAGY, E.-S. *et al.* Current challenges in non-invasive insulin delivery systems: a comparative review. **Advanced drug delivery reviews**, Tokyo, Japan, v. 59, n. 15, p. 1521-1546, 2007.

KHAN, J. *et al.* Effect of pregabalin and diclofenac on tactile allodynia, mechanical hyperalgesia and pro inflammatory cytokine levels (IL-6, IL-1B) induced by chronic constriction injury of the infraorbital nerve in rats. **Cytokine**, New York, USA, v.104, p.124-129, 2018.

KIILL, C. P. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana para potencial administração nasal da DISBa-01, uma desintegrina recombinante do veneno da serpente *Rhinocerophis alternatus***. 2012. 106f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2012.

KIM, K.H. *et al.* Development of a novel controlled-release tablet of pregabalin: formulation variation and pharmacokinetics in dogs and humans. **Drug Design, Development and Therapy**, Ansan, Republic of Korea, v. 14, p. 445-456, 2020.

KIM, S. *et al.* Preparation and Evaluation of non-effervescent gastroretentive tablets containing pregabalin for once-daily administration and dose proportional pharmacokinetics. **International Journal of Pharmaceutics**, Suwon, Republic of Korea, v. 550, n.1-2, p. 160-169, 2018.

KINGSLEY, J.D. *et al.* Nanotechnology: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, Omaha, USA, v. 1, p. 340-350, 2006.

KLAUMANN, P.R. *et al.* Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, Brasil, v.13, n.1, p. 1-12, 2008.

KOKUBO, H. *et al.* Development of cellulose derivatives as novel enteric coating agents soluble at pH 3.5–4.5 and higher. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokio, Japan, v. 45, p.1350–1353, 1997.

KREMER, M. *et al.* The antiallodynic action of pregabalin in neuropathic pain is independent from the opioid system. **Mol Pain**, Strasbourg, France, v.12, p.1-12, 2016.

KREUTER, J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: what do we know? **Adv. Drug Deliv. Rev.**, Frankfurt, Germany, n. 71, p. 2-14, 2014.

KUGLER, A.R. *et al.* Pregabalin overview: a novel CNS-active compound with anticonvulsant activity. Poster presented at the **Annual Meeting of the American Epilepsy Society**, Seattle, Washington, December 6–11, 2002.

KÜLKAMP, I. *et al.* Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Química Nova**, Porto Alegre, Brasil, v. 32, n. 8, 2009.

KUMBAR, S. G.; KULKARNI, A. R.; AMINABHVI, T. M.; J. Crosslinked chitosan microspheres for encapsulation of diclofenac sodium: effect of crosslinking agent. **Microencapsul.**, Dharwad, India, v.19, n.2, p.173-180, 2002.

- KURAIISHI, Y. *et al.* Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algescic tests. **Brain Research**, Kyoto, Japan, v.273, p. 245-252, 1983.
- LANNEAU, C. *et al.* Gabapentin is not a GABA(B) receptor agonist. **Neuropharmacology**, Taiwan, China, v.41, p.965-975, 2001.
- LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C.J. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, Charlestown, Massachusetts, USA, v.10, p.895-926, 2009.
- LAUS, R. *et al.* Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para a remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Quim. Nova**, Florianópolis, Brasil, v.29, n.1, p.34-39, 2006.
- LEHMAN-McKEEMAN, L.D. Absorption, distribution, and excretion of toxicants. In: KLAASSEN, C.D. (ed). **Casarett and Doull's Toxicology: the basic Science of poisons**. 7. ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2008.
- LI, C.; HEIN, S.; WANG, K. Chitosan-Carrageenan Polyelectrolyte Complex for the Delivery of Protein Drugs. **ISRN Biomaterials**, Singapore, v. 2013, p. 6, 2013.
- LI, S.D.; HUANG, L. Pharmacokinetics and biodistribution of nanoparticles. **Molecular Pharmacology**, Chapel Hill, North Carolina, USA, v.5, p.496-504, 2008.
- LIU, C.H.; WU, C.T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Taiwan, China, v. 353, n. 2-3, p. 149-156, 2010.
- LIU, R. *et al.* Stabilization of pH-sensitive mPEG-PH-PLA nanoparticles by stereo complexation between enantiomeric polylactides. **Macromolecular Rapid Communications**, Chengdu, China, v.33, n.12, p.1061-1066, 2012.
- LIU, Z. *et al.* Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Guangzhou, China, v. 60, n. 15, p. 1650–1662, 2008.
- LOESER, J.D.; TREEDE, R-D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, Seattle, USA, v.137, p.473-477, 2008.
- LOPES, C.M.; LOBO, J.M.S.; COSTA, P. Formas Farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Porto, Portugal, v. 41, n. 2, 2005.
- MADAN, J.R.; ADOKAR, B.R.; DUA, K. Development and evaluation of in situ gel of pregabalin. **Int. J Pharm Investig**, Pune, Maharashtra, India, v. 5, n. 4, p. 226-233, 2015.
- MAHMOUD, M. A. *et al.* Spectroscopic and thermal investigations on charge-transfer complexes formed in the reaction of pregabalin drug and various acceptors. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, Cairo, Egypt, v.6, n.11, p.570-580, 2014.

MAKHLOF, A. *et al.* Design and evaluation of novel pH-sensitive chitosan nanoparticles for oral insulin delivery. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Daigaku-nishi, Japan, v.42, p.445-451, 2011.

MARCOL, W. *et al.* Reduction of post-traumatic neuroma and epineural scar formation in rat sciatic nerve by application of microcrystalline chitosan. **Microsurgery**, Katowice, Poland, v.31, p.642-469, 2011.

MASSERINI, M. Nanoparticles for brain drug delivery. **ISRN Biochemistry**, Monza, Italy, v. 2013, 2013.

MATHA, K. *et al.* Bioinspired hyaluronic acid and polyarginine nanoparticles for DACHPt delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Angers, France, v. 150, p. 1-13, 2020.

MEDEIROS, K.A.A.L. *et al.* Depressant effects of geraniol on the central nervous system of rats: behavior and ECoG power spectra. **Biomedical Journal**, Itabaiana, Brazil, v. 41, n. 5, p. 298-305, 2018.

MELLO, F.B.; LANGELOH, A.; MELLO, J.R.B. Estudo de toxicidade e eficácia em ratos wistar de produto fitoterápico usado como sedativo e/ou hipnótico. **Lat. Am. J. Pharm.**, Buenos Aires, Argentina, v.26, n.1, p. 38-44, 2007.

MOHAMMED, M.A. *et al.* An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery. **Pharmaceutics**, Saskatoon, Canada, v.9, n.4, 2017.

MÖLLER, K.A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, Novum, Huddinge, Sweden, v.84, p. 41-47, 1998.

MONTEIRO JR., O. A. C.; AIROLDI, C. Some studies of crosslinking chitosan-glutaraldehyde interaction in a homogeneous system. **Int. J. Biol. Macromol.**, Campinas, São Paulo, Brasil, v.26, n.2-3, p.119-128,1999.

MONTEVALE, N.J. **Physicians Desk Reference**. 61. ed. Editora: Thomson PDR. P. 2539, 2007.

MOORE, R.A. *et al.* Pregabalin for acute and chronic pain in adults. **Cochrane Database. Syst. Rev**, Oxford, United Kingdom, v. 8, n. 3, 2009.

MUZZARELLI, R. A. A. Human enzymatic activities related to the therapeutic administration of chitin derivatives. **Cell Mol. Life Sci.**, Ancona, Italy, v.53, n.2, p.131-140, 1997.

MUZZARELLI, R. A. A. **Natural chelating polymers, alginic acid, chitin and chitosan**. Pergamon: Oxford, p. 1-254, 1973.

NAKAI, K. *et al.* Antinociceptive effects of mirtazapine, pregabalin, and gabapentin after chronic constriction injury of the infraorbital nerve in rats. **Journal of Oral Facial Pain Headache**, Okasawa, Japan, v.28, p. 61-67, 2014.

NASSIS, C.Z. *et al.* Estudo da ação depressora inespecífica do suco extraído das folhas de *Bryophyllum calycinum* Salisb. (*Crassulaceae*) sobre o sistema nervoso central. Comparação com efeitos da difenidramina. **Arquivos Médicos do ABC**, São Paulo, Brasil, v.14, n.2, p.64-68, 1991.

NATHAN, P.W. Pain. **British Medical Bulletin**, Oxford, United Kingdom, v.33, p.149-156, 1977.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. **PubChem compound database; CID=5486971**. Bethesda, Maryland, USA. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5486971>. Acesso em 24 out. 2016.

NAVES, V.M.L. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana e ftalato de hidroxipropilmetil celulose contendo metotrexato para potencial tratamento de glioblastoma**. 2018. 145f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2018.

OECD. **Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>. Acesso em 22 out. 2019.

OKAMOTO, Y. *et al.* Analgesic effects of chitin and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, Tottori-shi, Japan, v.49, p.249-252, 2002.

OLIVEIRA, R.B. *et al.* Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Goiânia, Goiás, Brasil, v.44, n.3, p. 485-491, 2008.

ORGANIZAÇÃO EUROPEIA DE PATENTES. **Patente Pregabalina**. 2003. Disponível em: www.escavador.com.br/patentes/383391/composicao-PG. Acesso em: 11 nov. 2016.

OSHITA, K. *et al.* Synthesis of novel chitosan resin derivatized with serine moiety for the column collection/concentration of uranium and the determination of uranium by ICP-MS. **Anal. Chim. Acta**, Tsushimanaka, Okayama, Japan, v.480, n.2, p.239-249, 2003.

PAŃCZYK, K. *et al.* Synthesis and activity of di- or trisubstituted N -(phenoxyalkyl)- or N -{2-[2-(phenoxy)ethoxy]ethyl}piperazine derivatives on the central nervous system. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, Krakow, Poland, v.28, n.11, p. 2039–2049, 2018.

PAPAGIANNI, M.; METALLIDIS, S.; TZIOMALOS, K. Herpes zoster and diabetes mellitus: a review. **Diabetes Therapy**, Thessaloniki, Greece, v.9, n.2, 2018.

PARK, S. *et al.* Pregabalin and gabapentin inhibit substance P-induced NF-kappa β activation in neuroblastoma and glioma cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, Seoul, Korea, v.105, p. 414-23, 2008.

PATIL, G.B.; SURANA, S.J. Bio-fabrication and statistical optimization of polysorbate 80 coated chitosan nanoparticles of tapentadol hydrochloride for central antinociceptive effect: *in vitro-in vivo* studies. **Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology**, Shirpur, Dhule, India, v.45, n.3, p. 505-514, 2017.

PEDREIRO, L.N. **Desenvolvimento de dispersões sólidas e nanopartículas poliméricas mucoadesivas de zidovudina e avaliação da interação biológica com a mucosa intestinal**. 2015. 149f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho”, Araraquara, 2015.

PERKINS, F.M.; KEHLET, H. Chronic pain as an outcome of surgery. **Anesthesiology**, New York, USA, v.93, n.4, p.1123-1133, 2000.

PERRET, D.; LUO, Z. Targeting voltage-gated calcium channels for neuropathic pain management. **Neurotherapeutics**, Irvine, California, USA, v. 6, p. 679–69, 2009.

PFIZER. **Bula do Lyrica CR®**. 2018. Disponível em: labeling.pfizer.com/ShowLabeling.aspx?id=9678. Acesso em: 20 jan. 2021.

PIMENTA, C.A.M. *et al.* Controle da dor no pós-operatório. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, São Paulo, Brasil, v. 35, n. 2, p. 180-3, jun. 2001.

PINEDAS-FARIA, J.B. *et al.* Ultra-low doses of naltrexone enhance the antiallodynic effect of pregabalin or gabapentin in neuropathic rats. **Drug Development Research**, Ciudad de México, Mexico, v.78, n.8, p.371-380, 2017.

PONCHEL, G.; IRACHE, J.M. Specific and non-specific bioadhesive particulate systems for oral delivery to the gastrointestinal tract. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Châtenay-Malabry Cedex, France, v. 34, p.191-219, 1998.

POWERS, K.W. *et al.* Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. **Toxicological Sciences**, Gainesville, Florida, USA, v. 90, p.296-303, 2006.

PRABAHARAN, M. Review paper: chitosan derivatives as promising materials for controlled drug delivery. **J. Biomater. Appl.**, Milwaukee, USA, v.23, n.1, p.5-36, 2008.

PREZOTTI, F. G. **Microesferas de goma gelana e pectina como potencial estratégia para liberação controlada de fármacos**. 111 f (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara. 2013

PUBCHEM, Banco de dados aberto de química. **Resumo do composto CID 5486971**, 2005. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5486971>. Acesso em: 23 jan. 2020.

QIN, C. *et al.* Design and optimization of gastro-floating sustained-release tablet of pregabalin: *in vitro* and *in vivo* evaluation. **International Journal of Pharmaceutics**, Nanjing, China, v.545, n. 1-2, p. 37-44, 2018.

RABASCO, A.M. **Novas formas de administração de medicamentos.** In: VILAJATO, J.L. (Ed.). *Tecnologia farmacêutica: formas farmacêuticas.* Madri: Síntesis, p. 379-445, v.2, 1997.

RAGUVARAN, R. *et al.* Sodium alginate and gum acacia hydrogels of zinc oxide nanoparticles reduce hemolytic and oxidative stress inflicted by zinc oxide nanoparticles on mammalian cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, Bareilly, India, v.101, p.967-972, 2017.

RAHMAN, M.M. *et al.* CNS depressant and antinociceptive effects of different fractions of *Pandanus foetidus* Roxb. Leaf extract in mice. **Malaysian Journal of Medical Science**, Chittagong, Bangladesh, v.22, n.3, p.33-40, 2015.

RANDALL, L.O.; SELITTO, J.J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissues. **Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Therapie**, v. 111, p.409-419, 1957.

RANDINITIS, E.J. *et al.* Pharmacokinetics of pregabalin in subjects with various degrees of renal function. **Journal of Clinical Pharmacology**, Ann Arbor, USA, v.43, p. 277-83, 2003.

RANG, H.P. *et al.* **Rang & Dale Farmacologia.** 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAUSCHER, H. *et al.* **An overview of concepts and terms used in the European Commission's definition of nanomaterial,** 2019. Disponível em: <https://ec.europa.eu/jrc/en/publication/overview-concepts-and-terms-used-european-commissions-definition-nanomaterial>. Acesso em: 09 jan. 2020.

RAVINDRAN, S. *et al.* Pharmacokinetics, metabolism, distribution and permeability of nanomedicine. **Current Drug Metabolism**, Pune, India, v.19, n. 4, p.327-334, 2018.

REZVANI, M.E. *et al.* Anticonvulsant and depressant effects of aqueous extracts of *Carum copticum* seeds in male rats. **Epilepsy & Behavior**, Yazd, Iran, v. 22, n. 2, p. 220-225, 2011.

RIBEIRO, D.E. *et al.* Inhibition of nitric oxide synthase accentuates endotoxin-induced sickness behavior in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, Alfenas, Minas Gerais, Brazil, v.103, p.535-540, 2013.

RILEY, H.; SPINKS, A. Biological assessment of tranquilizers. **Journal of pharmacy and pharmacology**, Macclesfield, Cheshire, v.10, p. 657-671, 1958.

RODRIGUES, R.F. **Influência da duloxetina e amitriptilina na farmacocinética e efeito biológico da PG para tratamento da dor crônica em animais.** 2016. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2016.

ROGER, E. *et al.* Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. **Nanomedicine**, Saint-Cloud Cedex, France, v. 5, p.287-306, 2010.

- ROSCA, C. *et al.* Polyelectrolyte complexes of chitosan with dextran sulphate. Synthesis and characterization. **Cellulose Chemistry and Technology**, Iasi, Romania, v. 45, n. 34, p. 185 -189, 2011.
- ROSLAND, J.H.; HUNSKAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **Pharmacology & Toxicology**, Bergen, Norway, v.66, p. 382-386, 1990.
- RUDDY, K.; MAYER, E.; PATRIDGE, A. Patient adherence and persistence with oral anticancer treatment. **CA – A Cancer Journal for Clinicians**, Boston, USA, v.59, p.55-66, 2009.
- RUELA, A.L.M. *et al.* Molecularly imprinted microparticles in lipid-based formulations for sustained release of donepezil. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, Vitória da Conquista, Brazil, v. 93, p. 114-122, 2016.
- RYU, J. *et al.* Effects of pregabalin on the activity of glutamate transporter type 3. **British Journal of Anaesthesia**, Gyeonggi-do, Republic of Korea, v. 109, p. 234–239, 2012.
- SANTOS, J.S. **Nanopartículas: aplicações cosméticas e farmacêuticas**. São Paulo: Pharmabooks, 2010.
- SANTOS, S.R.C.J. *et al.* Controle terapêutico. In: OGA, S. **Fundamentos da Toxicologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.
- SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, Porto Alegre, Brasil, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.
- SCHOLZ, J. *et al.* The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. **Pain**, New York, United States, v. 160, n. 1, p. 53-59, 2019.
- SCOTT, W. *et al.* A qualitative study of the experience and impact of neuropathic pain in people living with HIV. **Pain**, London, United Kingdom, v.1, 2019.
- SERAFIM, M.C. *et al.* A utilização da forma farmacêutica transdérmica como possibilidade terapêutica na medicina antroposófica. **Arte Médica Ampliada**, São Paulo, Brasil, v. 33, n. 4, p.153-159, 2013.
- SERPELL, M. *et al.* Neuropathic pain responds better to increased doses of pregabalin: an in-depth analysis of flexible-dose clinical trials. **Journal of Pain Research**, Glasgow, v. 10, p. 1769-1776, 2017.
- SHARGEL, L.; WU-PONG, S.; YU, A. **Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics**. 6. ed. New York: The McGraw-Hill Companies, 2012.
- SHEAHAN, T. Pain 101 – Neuropathic pain: one size does not fit all, **Relief**, 2018. Disponível em: <https://relief.news/pain-101-neuropathic-pain-one-size-does-not-fit-all/>. Acesso em: 02 jan. 2020.

SHIN-ETSU. Hypromellose Phthalate NF. HPMCP. Enteric Coating

Material. 2018. Disponível em:

<https://www.metolose.jp/en/pharmaceutical/hpmcp.html>. Acesso em: 30 jul. 2020.

SIGMA-ALDRICH. Chitosan. Disponível em:

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/chitosan12345901276411?lang=pt®ion=BR>. Acesso em: 30 jul. 2020.

SILVA, J.C. *et al.* Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, Petrolina, Brasil, v.94, n.1, p. 18-23, 2013.

SILVERSTEIN, R. *et al.* **Spectrometric identification of organic compounds.** Wiley, Massachusetts, United States of America, 8 ed., 2014.

SIMS, L.B. *et al.* Distribution of PLGA-modified nanoparticles in 3D cell culture models of hypo-vascularized tumor tissue. **Journal of Nanobiotechnology**, Louisville, USA, v.15, n.67, 2017.

SIPOS, P. *et al.* An assessment of the interactions between diclofenac sodium and ammonium methacrylate copolymer using thermal analysis and Raman spectroscopy. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, Szeged, Hungary, v. 46, n. 2, p. 288-294, 2008.

SMALLWOOD, R.F. *et al.* Structural brain anomalies and chronic pain: a quantitative meta-analysis of gray matter volume. **Journal of Pain**, San Antonio, Texas, USA, v.14, p.663-675, 2013.

SOARES, A.C. *et al.* Activation of ATP-sensitive K⁺ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **European Journal of Pharmacology**, Belo Horizonte, Brazil, v. 400, p. 67-71, 2000.

SOARES, G. A. *et al.* Blends of crosslinked high amylose starch/pectin loaded with diclofenac. **Carbohydrate Polymers**, Araraquara, Brazil, v. 91, n. 1, p. 135-142, 2013.

SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O ESTUDO DA DOR (SBED). **Tradução para a língua portuguesa da definição revisada de dor pela Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor.** 2020. Disponível em: sbed.org.br/wp-content/uploads/2020/08/Definição-revisada-de-dor_3.pdf. Acesso em: 14 abr. 2021.

SOLOMONS, T.W.G; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica.** 10. ed., v.2. Rio De Janeiro: LTC, 2012.

SOUSA, A.M. *et al.* Experimental models for the study of neuropathic pain. **Revista Dor**, São Paulo, Brazil, v.17, n.1, p. 527-530, 2016.

STELLA, B. *et al.* Encapsulation of gemcitabine lipophilic derivatives into polycyanoacrylate nanospheres and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, Torino, Italy, v.344, n.1-2, p.71-77, 2007.

SU, T.Z.; FENG, M.R.; WEBER, M.L. Mediation of highly concentrative uptake of pregabalin by L-type amino acid transport in Chinese hamster ovary and Caco-2 cells. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, Rockville, USA, v. 313, p.1406-1415, 2005.

SULTANA, H. *et al.* Development and evaluation of chitosan based oral controlled release matrix tablets of pregabalin. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science**, Nagara, Karnataka, India, v.4, n.06, p. 1306-1319, 2015.

SUTO, T. *et al.* Gabapentin increases extracellular glutamatergic level in the locus coeruleus via astroglial glutamate transporter-dependent mechanisms. **Neuropharmacology**, Winston-Salem, USA, v.81, p.95-100, 2014.

SUTO, T.; EISENACH, J.C.; HAYASHIDA, K. Peripheral nerve injury and gabapentin, but not their combination, impair attentional behavior via direct effects on noradrenergic signaling in the brain. **Pain**, Winston-Salem, USA, v.155, p.1935-1942, 2014.

TABARAKI, R.; SADEGHINEJAD, N. Comparison of magnetic Fe₃O₄/chitosan and arginine-modified magnetic Fe₃O₄/chitosan nanoparticles in simultaneous multidyedye removal: experimental design and multicomponent analysis. **International Journal of Biological Macromolecules**, Ilam, Iran, v. 120, part B, p.2313-2323, 2018.

TAKSANDE, J.B.; UMEKAR, M.J. Preparation of intranasal pregabalin microspheres: *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* pharmacodynamic evaluation. **Journal of Pharmacy Research**, Maharashtra, India, v. 12, n. 1, p. 112-121, 2018.

TASSONE, D.M. *et al.* Pregabalin: a novel gamma-aminobutyric acid analogue in the treatment of neuropathic pain, partial-onset seizures, and anxiety disorders. **Clinical Therapeutics**, Wingate, North Carolina, USA, v.29, n.1, p. 26-48, 2007.

TAYLOR, C.P.; ANGELOTTI, T.; FAUMAN, E. Pharmacology and mechanism of action of pregabalin: the calcium channel alpha₂-delta (alpha₂-delta) subunit as a target for antiepileptic drug discovery. **Epilepsy Research**, Ann Arbor, USA, v. 73, p. 137-150, 2007.

THAI, H. *et al.* Characterization of chitosan/alginate/lovastatin nanoparticles and investigation of their toxic effects *in vitro* and *in vivo*. **Scientific Reports**, Cau Giay, Hanoi, Vietnam, v. 10, p. 909, 2020.

THE CAMBRIDGE STRUCTURAL DATABASE (CSD). **Difração de raios-x da PG**. Disponível em: <https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-system/components/csd/>. Acesso em: 18 jun. 2018.

THE INDIAN PHARMACOPOEIA COMMISSION. **Indian pharmacopoeia**, Gaziabad, Índia, v.2, p.1960, 2010.

TONHI, E.; PEPLIS, A. M. G. Obtenção e caracterização de blendas colágeno-quitosana. **Quim. Nova**, Campinas, Brasil, v.25, n.6, p.943-948, 2002.

- TREEDE, R.D. *et al.* Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes. **Neurology**, Mainz, Germany, v.70, n.18, p. 1630-1635, 2008.
- TSCHARNUTER, W. Photon Correlation Spectroscopy in Particle Sizing. In: **Encyclopedia of Analytical Chemistry**. Chichester: R.A. Meyers, p. 5469-5485, 2000.
- VARTANIAN, M. *et al.* Activity profile of pregabalin in rodent models of epilepsy and ataxia. **Epilepsy Research**, Ann Arbor, USA, v. 68, p. 189–205, 2006.
- VASCONCELOS, F.H.; ARAÚJO, G.C. Prevalence of chronic pain in Brazil: a descriptive study. **Brazilian Journal of Pain**, Palmas, Brazil, v.1, n.2, p.176-179, 2018.
- VERMA, R. *et al.* Investigating the possible pain attenuating mechanisms of pregabalin in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **International Journal of Neuroscience**, Patiala, India, v. 129, n. 12, p. 1155-1165, 2019.
- VERONESI, V. B. *et al.* Maternal dipyrrone treatment during lactation in mice reduces maternal behavior and increases anxiety-like behavior in offspring. **International Journal of Developmental Neuroscience**, Alfenas, Brazil, v. 58, p. 74–81, 2017.
- VINIK A, CASELLINI C, NEVORET ML. **Diabetic Neuropathies**. [Updated 2018 Feb 5]. In: Feingold KR, Anawalt B, Boyce A, *et al.*, editors. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279175/>. Acesso em: 27 jun. 2020.
- VON FREY, M. Untersuchungen über die sinnesfunctionen der menschlichen haut: bandes der abhandlungen der mathematisch-physischen classe der königl. **Sächsischen Gesellschaft der Wissenschaften**, Germany, v. 23, p. 175-266, 1896.
- WANG, J. *et al.* Therapeutic potential of hyaluronic acid/chitosan nanoparticles for the delivery of curcuminoid in knee osteoarthritis and an *in vivo* evaluation of chondrocytes. **International Journal of Molecular Medicine**, Shanghai, P.R. China, v.42, p. 2604-2616, 2018.
- WANG, L. *et al.* Preparation and evaluation of solid dispersion for nitrendipine–carbopol and nitrendipine–HPMCP systems using a twin screw extruder. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Shenyang, China, v. 53, n. 10, p. 1240-1245, 2005.
- WANG, Y. *et al.* Applications of mesoscale simulation to explore the aggregate morphology of pH-sensitive nanoparticles used as the oral drug delivery carriers under different conditions. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Beijing, China, v.151, p.280-286, 2017.
- WASAN, A.D. *et al.* Test-retest and inter-examiner reliability of a novel bedside quantitative sensory testing battery in postherpetic neuralgia patients. The **Journal of Pain**, Pittsburgh, Pennsylvania, USA, 2019.

WASZKIELEWICZ, A.M. *et al.* Evaluation of anticonvulsants for possible use in neuropathic pain. **Current Medicinal Chemistry**, Krakow, Poland, v.18, p.4344-4358, 2011.

WATSON, J.C.; SANDRONI, P. Central neuropathic pain syndromes. **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, USA, v.91, n.3, p.372-385, 2016.

WHITTLE, B.A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, Macclesfield, Cheshire, v.22, p. 246-253, 1964.

WILSON, B. *et al.* Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. **Nanomedicine**, Ootacamund, Tamil Nadu, India, v.6, n.1, p. 144-152, 2010.

XAVIER, G.F. A modularidade da memória e o sistema nervoso. **Psicologia USP**, São Paulo, Brasil, v.4, p. 61-115, 1993.

YADAV, M. R. *et al.* Studies on the Crystal forms of pefloxacin: preparation, characterization and dissolution profile. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, Baroda, India, v. 97, n. 7, p. 2637-48, 2008.

YAJIMA, R. *et al.* Pharmacokinetic and pharmacodynamic studies of pregabalin suppositories based on pharmacological research. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Tokyo, Japan, v.71, n. 5, p. 746-752, 2019.

YAM, M.F. *et al.* General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. **International Journal of Molecular Science**, Serdang, Malaysia, v. 19, n. 8, p.2164, 2018.

YASMIN, R. *et al.* Gelatin nanoparticles: a potential candidate for medical applications. **Nanotechnology Reviews**, Peshawar, Pakistan, v.6, n.2, p. 191-207, 2016.

YOSHIZUMI, M. *et al.* Gabapentin inhibits gamma-amino butyric acid release in the locus coeruleus but not in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury in rats. **Anesthesiology**, Winston-Salem, USA, v.116, p.1347-1353, 2012.

YUAN, Z.Y.; HU, Y.L.; GAO, J.Q. Brain localization and neurotoxicity evaluation of polysorbate 80-modified chitosan nanoparticles in rats. **Plos One**, Hangzhou, China, v. 10, n. 8, p. e0134722, 2015.

ZHANG, L. *et al.* Local anesthetic lidocaine delivery system: chitosan and hyaluronic acid-modified layer-by-layer lipid nanoparticles. **Drug Delivery**, Jining, China, v.23, n.9, p. 3529-3537, 2016.

ZHANG, Y. *et al.* PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. **Comput Methods Programs Biomed**, Tongjiang, China, v.99, p.306-314, 2010.

ZILLIOX, L.A. Neuropathic pain. **Continuum**, Baltimore, USA, v.23, n.2, p. 512-532, 2017.

APÊNDICE A – MATERIAIS UTILIZADOS

Equipamentos

- Agitador horizontal de tubos MA.139/CFT/UN, Marconi[®], Brasil
- Agitador magnético Multi Stirrer, Velp Scientifica[®], Itália
- Agulha de gavagem para ratos, INSIGHT[®], Brasil
- Filamentos de von Frey, ANESTHESIO[®], Estados Unidos
- Balança analítica 410, Kern[®], Brasil
- Balão volumétrico 1 mL, LABTEC[®], Brasil
- Balão volumétrico 10 mL, IONGLASS[®], Brasil
- Balão volumétrico 100 mL, Pyrex[®], Brasil
- Balão volumétrico 1000 mL, Pyrex[®], Brasil
- Balão volumétrico 2 mL, AC-GLASS[®], Brasil
- Balão volumétrico 25 mL, PER-LAB[®], Brasil
- Balão volumétrico 250 mL, Pyrex[®], Brasil
- Balão volumétrico 5 mL, VIDROLABOR[®], Brasil
- Balão volumétrico 50 mL, Pyrex[®], Brasil
- Balão volumétrico 500 mL, Pyrex[®], Brasil
- Banho ultrassônico USC-2800a, Unique[®], Brasil
- Barra magnética, PHOX[®], Brasil
- Béquer 10 mL, DELTEX BRASIL[®], Brasil
- Béquer 100 mL, Qualividros[®], Brasil
- Béquer 250 mL, Qualividros[®], Brasil
- Béquer 50 mL, PHOX[®], Brasil
- Bomba de vácuo New Pump, Sparmax[®], Brasil
- Calorímetro exploratório diferencial DSC 3500 Sirius, Netzsch[®], Alemanha
- Centrífuga de tubos 80-2B CENTRIBIO[®], Brasil
- Centrífuga microtubos DTC 16000 DAIKI[®], Japão
- Coluna cromatográfica C18 NST[®] (150mm x 4,6mm x 05µm), Brasil
- Coluna cromatográfica BEH HILIC ACQUITY UPLC (2,1mm x 50mm x 1,7µm), Waters[®], Estados Unidos

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência com detector UV-Vis LC-20AT Shimadzu®, Japão
- Cromatógrafo líquido de ultra eficiência acoplado ao espectrômetro de massas LCMS-8030, Shimadzu®, Japão
- Difratorômetro de raios X Ultima IV, Rigaku®, Japão
- Difusor vertical (célula de Franz), Variomag Telesystem, Komet®, Estados Unidos
- Eletrodo de pH blindado semissólido e líquido SC06, Sensoglass®, Brasil
- Espectrofotômetro de absorção no infravermelho com transformada de Fourier IRAffinity-1, Shimadzu®, Japão
- Fio de nylon agulhado para sutura, Shalon®, Brasil
- Fio de seda agulhado para sutura, Technew®, Brasil
- Freezer (-20°C) F-21 smile, Prosdócimo®, Brasil
- Material cirúrgico (bisturi, tesouras, pinças), Golgram®, Brasil
- Micropipeta de volume variável 100-1000 µL, Peguepet®, Brasil
- Microscópio eletrônico de alta resolução de emissão por campo (MEV-FEG), marca JEOL, modelo JSM-7500F, com software de operação PC-SEM v 2,1,0,3, equipado com detectores de elétrons secundário, retroespalhados e análise química (Energy dispersive spectroscopy - EDS) da marca Thermo Scientific, modelo Ultra Dry, com software de operação NSS 2.3
- Misturador tipo vórtex MAXI MIX II, Thermolyne®, Estados Unidos
- Membrana de diálise SPECTRA/POR 4 MEMBRANE 12-14000Da, Spectrum®, Estados Unidos, lote: #*3203991*
- Módulo termogravimétrico simultâneo TG/DTA 7300, Extar®, Japão
- Nanosight NS 300, Malvern Instruments®, Inglaterra
- Parafilm "M" – Laboratory Film– Bemis®, Estados Unidos
- pHmetro mPA-210, MS TECNOPON®, Brasil
- Pipeta graduada 0,2 mL, Vidrolabor®, Brasil
- Pipeta graduada 1 mL, Pyrex®, Brasil
- Pipeta graduada 5 mL, Glasstécnica®, Brasil
- Pipetador de volume ajustável 20-200 µL, KACIL®, Brasil
- Pipetador de volume ajustável 2-15 µL, KACIL®, Brasil
- Proveta volumétrica 10 mL, Laborglass®, Brasil
- Proveta volumétrica 100 mL, DiogoLab®, Brasil
- Proveta volumétrica 1000 mL, Easy Path®, Brasil

- Proveta volumétrica 200 mL, DiogoLab[®], Brasil
- Proveta volumétrica 25 mL, Laborglass[®], Brasil
- Proveta volumétrica 50 mL, PlenaLab[®], Brasil
- Proveta volumétrica 500 mL, Qualividros[®], Brasil
- Secadora e concentradora de amostras CentriVap Concentrator, LABCONCO[®], Estados Unidos
- Seringa descartável para insulina 1mL (agulha 13 x 0,45mm), Descarpack[®], Brasil
- Silastic Select Silicone 0,50x0,93x0,20 mm, Gold Lab[®], Brasil
- Sistema de ultrapurificação de água Milli Q Academic, Millipore[®], Estados Unidos
- Ultrafreezer (-80°C) Glacier, Nuair[®], Brasil
- Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments[®], Inglaterra

Reagentes

- Acetona PA – A.C.S, Alphatec[®], Brasil.
- Acetonitrila HPLC, J.T. Baker[®], Estados Unidos.
- Ácido acético glacial PA-ACS, Dinâmica Química Contemporânea Ltda., Brasil.
- Ácido clorídrico 37% PA- A.C.S, Alphatec[®], Brasil.
- Formiato de amônio para HPLC (≥99,0%) – Sigma Aldrich[®], Estados Unidos.
- Fosfato de sódio dibásico heptahidratado PA-ACS, Vetec[®], Brasil.
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado PA, PROQUÍMIOS[®], Brasil.
- Fosfato de sódio tribásico.12 H₂O PA, Vetec[®], Brasil.
- Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose, Shin-Etsu Chemical Co. Ltda., Japão.
- Hidróxido de sódio PA-ACS, Sigma-Aldrich[®], Estados Unidos.
- Metanol HPLC, J.T. Baker[®], Estados Unidos.
- Quitosana de camarão de baixa viscosidade (150kDa), Sigma-Aldrich[®], Estados Unidos.
- Selante de silicone 768, Dow Corning[®], Estados Unidos

Medicamentos

- Cloridrato de cetamina 10% injetável, Linavet, Brasil.
- Heparina sódica injetável, Blau Farmacêutica S.A., Brasil.
- Isoflurano, Cristália, Brasil.

- Metformina, USP Reference Standard, Rockville, Estados Unidos.
- Pregabalina, Musgo Farmácia de Manipulação, Brasil.
- Tiopental sódico, Cristália, Brasil.
- Xilazina injetável, Hertape Calier Saúde Animal S.A, Brasil.

APÊNDICE B – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (HPLC-UV) PARA AVALIAÇÃO DA TAXA DE ASSOCIAÇÃO DA PG À NP E LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Os ensaios de validação foram realizados segundo a RDC 166/2017 (BRASIL, 2017) e foram avaliados os seguintes parâmetros: seletividade, linearidade, precisão e exatidão intra e interdias, efeito residual, determinação do limite inferior de detecção e quantificação. A legislação não determina qual o valor de variação aceitável, sendo assim, assumiu-se valores de variação aceitáveis definidos pela RDC 27/2012 (BRASIL, 2012).

- **Seletividade**

A seletividade do método é definida pela capacidade do método identificar ou quantificar o analito de interesse, de maneira não equivocada, na presença de componentes que podem estar presentes, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (BRASIL, 2017).

A seletividade foi feita avaliando-se os tempos de retenção (TR) no analito e dos possíveis interferentes (quitosana, HPMCP e NP VAZ). A PG apresentou TR médio de 8 minutos, a quitosana apresentou TR médio de 1,62 minutos, o HPMCP apresentou TR médio de 1,8 minutos e a NP VAZ apresentou TR médio de 1,61 minutos. Dessa forma, o método se mostrou seletivo.

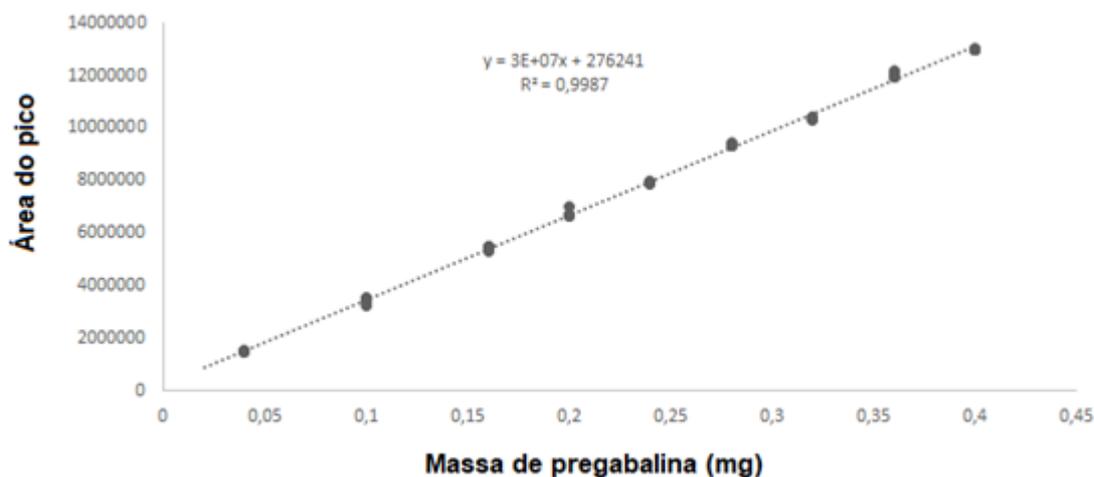
- **Linearidade**

A linearidade garante que os parâmetros correlacionados (massa e área, nesse caso) tenham uma relação linear, ou seja, diretamente proporcional (BRASIL, 2017).

A relação entre massa e resposta (área do pico) foi definida por meio de uma curva analítica, representada por uma equação de primeiro grau, do tipo $y=ax+b$, e se mostrou linear no intervalo de 0,04 - 0,4mg de PG, já que o valor do coeficiente

de correlação linear foi igual a 0,9993, estando dentro do valor estabelecido como aceitável pela legislação (BRASIL, 2017) (FIGURA 34).

Figura 34 - Curva analítica da PG em solvente (HPLC-UV)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

- **Limite inferior de quantificação (LIQ)**

O limite de quantificação foi determinado através da aplicação do método de preparo de amostra, desenvolvido de tal forma que o analito fosse quantificado na menor concentração possível com coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$. Sua determinação foi realizada por meio de 6 replicatas (BRASIL, 2012).

O limite de quantificação obtido na metodologia desenvolvida foi de 0,04mg de PG, com coeficiente de variação bem inferior a 20% para precisão e exatidão, se mostrando adequado ao intervalo terapêutico (TABELA 6).

Tabela 6 - Limite inferior de quantificação para a PG (HPLC - UV)

		PG	
LIQ(0,4 mg de PG)	Intracorrída n=6	Precisão (CV%)	1,44
		Exatidão (Inexatidão%)	4,14
	Intercorrída n=2	Precisão (CV%)	0,048
		Exatidão (Inexatidão%)	2,39

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

CV = coeficiente de variação [(dp/média)x100]

% Inexatidão = [(C_{obs} - C_{adicionada})/C_{adicionada}] \times 100

- **Limite de detecção (LD)**

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2017).

Este parâmetro pode ser calculado segundo a fórmula:

$$LD = \frac{3,3x \text{ dp branco}}{\text{inclinação da curva}}$$

Onde, dp branco = desvio padrão de 10 amostras de branco.

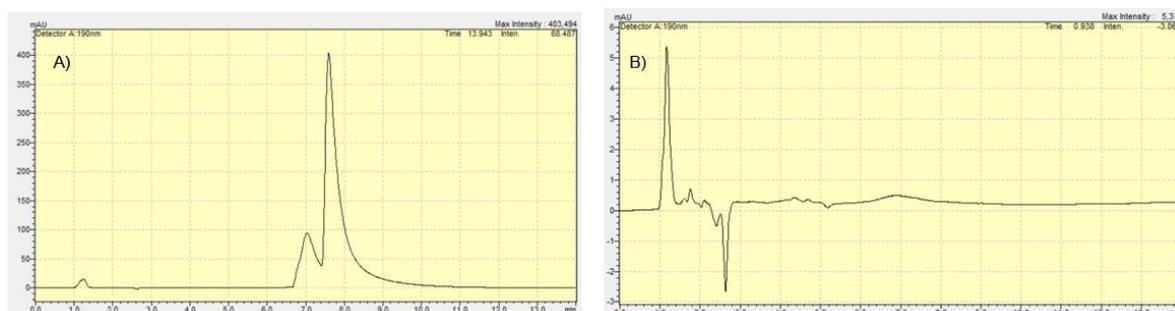
O limite de detecção estimado foi de $2,43926 \times 10^{-11}$ mg/mL, sendo o valor adequado.

- **Efeito residual**

O efeito residual (*carry over*) é o efeito causado por contaminação proveniente de análises anteriores às quais podem levar ao aparecimento ou aumento do sinal do fármaco. O efeito residual foi testado fazendo-se uma injeção da amostra branco, duas injeções do limite superior de quantificação e em seguida uma injeção da amostra branco (BRASIL, 2017).

Por este teste foi possível observar que a PG não apresentou *carry over* significativo, já que não apresentou pico de PG na amostra do branco (FIGURA 35)

Figura 35 - *Carry over* PG HPLC-UV



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: A) Pico de PG em fase móvel; B) Amostra do branco, com monitoramento da PG.

- **Precisão e exatidão intra e intercorridas**

A precisão avalia, em idênticas condições de ensaio, o grau de repetibilidade entre os resultados individuais de análises. Este parâmetro é expresso como coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) (BRASIL, 2017).

$$CV (\%) = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Média}}$$

Média

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor nominal. A exatidão foi avaliada por meio do cálculo do Erro Padrão Relativo (EPR) conforme fórmula abaixo.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{\text{concentração média determinada} - \text{concentração teórica}}{\text{Concentração teórica}} \times 100$$

Concentração teórica

A precisão e a exatidão intracorrida foram avaliadas em um mesmo dia (n=6 para cada replicata) e a intercorridas em dois dias diferentes (n=2). Não se admite valores acima de 15 % do valor nominal, com exceção do LIQ para o qual o valor estabelecido é de 20 % (BRASIL, 2012).

Foi determinada a precisão e exatidão intra e intercorridas (TABELA 7) para os controles de qualidade (baixo (CQB) – 0,1 mg, médio (CQM) – 0,24 mg e alto (CQA) – 0,36 mg) e para o LIQ (TABELA 6). Os resultados de precisão e exatidão estão de acordo com os valores aceitos pela RDC 27/2012, mostrando que o método é preciso e exato.

Tabela 7 - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de PG por HPLC-UV

		CQB	CQM	CQA
Intracorrida (n=6)	Precisão (CV%)	3,49	0,34	0,79
	Exatidão (Inexatidão %)	5,79	6,20	8,69
Intercorrida (n=2)	Precisão (CV%)	3,84	2,53	3,25
	Exatidão (Inexatidão %)	8,60	8,68	10,41

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

CV% = coeficiente de variação $[(dp/média) \times 100]$

% Inexatidão = $[(C_{obs} - C_{adicionada}) / C_{adicionada}] \times 100$

APÊNDICE C – VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO (UPLC-MS/MS) PARA AVALIAÇÃO DA FARMACOCINÉTICA

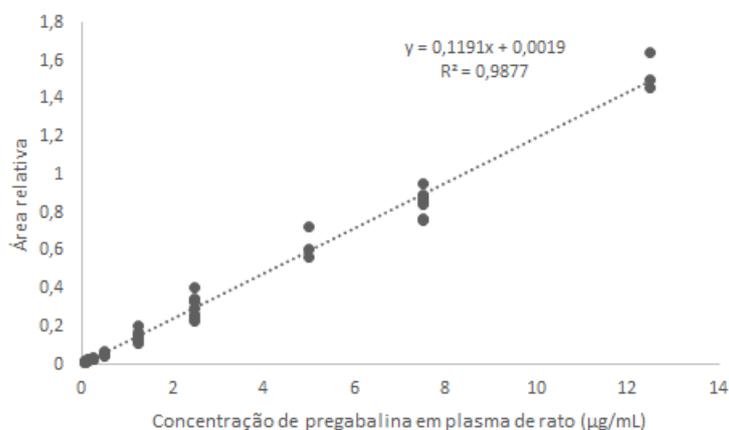
Os ensaios de validação foram realizados segundo a RDC 27/2012 (BRASIL, 2012) e foram avaliados os seguintes parâmetros: linearidade, precisão e exatidão intra e interdias, efeito matriz, efeito residual, determinação do limite inferior de detecção e quantificação, estabilidade de curta duração, estabilidade de longa duração, estabilidade após ciclos de congelamento e estabilidade pós-processamento.

- **Linearidade**

A linearidade garante que os parâmetros correlacionados (concentração e área, nesse caso) tenham uma relação linear, ou seja, diretamente proporcional (BRASIL, 2012).

A relação entre concentração e resposta (área relativa = área PG/área metformina) foi definida por meio de uma curva analítica, representada por uma equação de primeiro grau, do tipo $y=ax+b$, e se mostrou linear no intervalo de 0,1-12,50 μ g/mL de PG em plasma, já que o valor do coeficiente de correlação linear foi igual a 0,9938, estando dentro do valor estabelecido como aceitável pela legislação (FIGURA 36).

Figura 36 - Curva analítica da PG em plasma de rato (UPLC-MS/MS)



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

- **Limite inferior de quantificação (LIQ)**

O limite de quantificação foi determinado através da aplicação do método de preparo de amostra, desenvolvido de tal forma que o analito fosse quantificado na menor concentração possível com coeficiente de variação (CV) $\leq 20\%$. Sua determinação foi realizada por meio de 6 replicatas (BRASIL, 2012).

O limite de quantificação obtido na metodologia desenvolvida foi de 0,1 µg/mL de plasma, com coeficiente de variação inferior a 20% para precisão e exatidão, se mostrando adequado ao intervalo terapêutico (TABELA 8).

Tabela 8 - Limite inferior de quantificação para a PG (UPLC-MS/MS)

		PG	
LIQ(0,1µg/mL)	Intracorrída n=6	Precisão (CV%)	2,46
		Exatidão (Inexatidão%)	11,19
	Intercorrída n=3	Precisão (CV%)	7,23
		Exatidão (Inexatidão%)	12,36

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

CV% = coeficiente de variação [(dp/média)x100]

% Inexatidão = [(C_{obs} - C_{adicionada})/C_{adicionada}] \times 100

- **Limite de detecção (LD)**

O limite de detecção é a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2012).

Este parâmetro pode ser calculado segundo a fórmula:

$$LD = \frac{DPa \times 3}{\text{inclinação da curva}}$$

Onde, DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo do Y da curva analítica.

O limite de detecção estimado foi de 1,17µg/mL, sendo o valor adequado ao intervalo terapêutico.

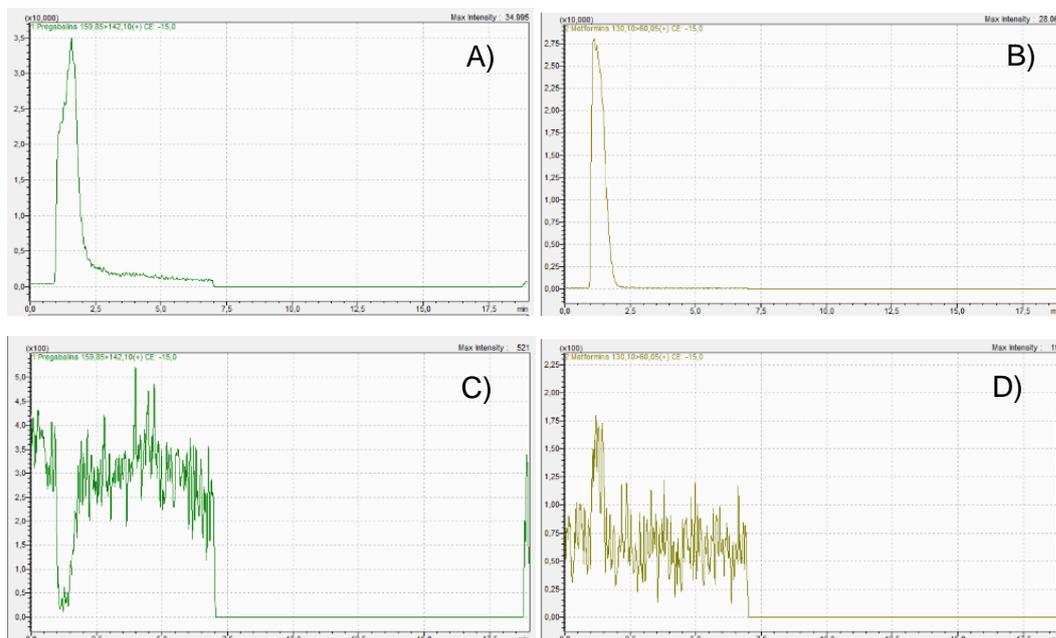
- **Efeito residual**

O efeito residual (*carry over*) é o efeito causado por contaminação proveniente de análises anteriores às quais podem levar ao aparecimento ou aumento do sinal do fármaco ou padrão interno. O efeito residual foi testado

fazendo-se uma injeção da amostra branco, três injeções do limite superior de quantificação e em seguida uma injeção da amostra branco (BRASIL, 2012).

Por este teste foi possível observar que a PG não apresentou *carry over* significativo (FIGURA 37), já que não apareceu pico de PG na amostra do branco (FIGURA 37 C)

Figura 37 - *Carry over* PG UPLC-MS/MS



Fonte: Elaborado pela autora (2021).

Legenda: A) Pico de PG em pool de plasma; B) Pico de metformina (PI) em pool de plasma; C) Amostra do branco, com monitoramento de m/z de PG; D) Amostra do branco, com monitoramento de m/z de metformina

● Efeito matriz

O efeito matriz foi feito utilizando-se oito matrizes biológicas distintas, sendo quatro normais, duas lipêmicas e duas hemolisadas. As matrizes foram processadas e em seguida adicionou-se solução de padrão interno (PI) e analito nas mesmas concentrações de controle de qualidade baixo (CQB= 0,175µg/mL em plasma) e controle de qualidade alto (CQA= 7,5µg/mL em plasma), com n=4 para cada controle de qualidade. O cálculo do efeito dos componentes sobre o analito foi realizado de acordo com a fórmula descrita abaixo. São aceitos valores de coeficiente de variação (CV) para o fator de matriz normalizado (FMN) menor que 15% (BRASIL, 2012).

$$\text{FMN} = \frac{\text{Resposta do analito em matriz/resposta do PI em matriz}}{\text{Resposta do analito em solução/resposta do PI em solução}}$$

Foi avaliado o efeito matriz para o controle de qualidade baixo (CQB) e para o controle de qualidade alto (CQA). Por este teste foi possível observar que a PG e nem o PI não sofrem efeito matriz, já que os coeficientes de variação (para CQB foi de 9,36% e para CQA foi de 14,43%) estão dentro dos limites aceitáveis pela RDC 27/2012.

- **Precisão e exatidão intra e intercorridas**

A precisão avalia, em idênticas condições de ensaio, o grau de repetibilidade entre os resultados individuais de análises. Este parâmetro é expresso como coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) (BRASIL, 2012).

$$\text{CV (\%)} = \frac{\text{Desvio padrão} \times 100}{\text{Média}}$$

A exatidão representa a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor nominal. A exatidão foi avaliada por meio do cálculo do Erro Padrão Relativo (EPR) conforme fórmula abaixo.

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{(\text{concentração média determinada} - \text{concentração teórica}) \times 100}{\text{Concentração teórica}}$$

A precisão e a exatidão intracorrida foram avaliadas em um mesmo dia (n=6 para cada replicata) e a intercorridas em três dias diferentes (n=3). Não se admite valores acima de 15 % do valor nominal, com exceção do LIQ para o qual o valor estabelecido é de 20 % (BRASIL, 2012).

Foi determinada a precisão e exatidão intra e intercorridas (TABELA 9) para os controles (baixo (CQB= 0,175µg/mL em plasma), médio (CQM= 2,5µg/mL em plasma) e alto (CQA= 7,5µg/mL em plasma)) e para o LIQ (LIQ= 0,1µg/mL em plasma) (TABELA 8). Os resultados de precisão e exatidão estão de acordo com os valores aceitos pela RDC 27/2012, mostrando que o método é preciso e exato.

Tabela 9 - Precisão e exatidão intracorridas e intercorridas referente ao método analítico para quantificação de PG em plasma de rato por UPLC-MS/MS

		CQB	CQM	CQA
Intracorrida (n=6)	Precisão (CV%)	1,95	14,94	8,12
	Exatidão (Inexatidão %)	5,07	-8,11	-4,73
Intercorrida (n=3)	Precisão (CV%)	4,00	13,18	8,33
	Exatidão (Inexatidão %)	0,26	-7,09	-6,77

Fonte: Elaborado pela autora (2021).

CV% = coeficiente de variação $[(dp/média) \times 100]$

% Inexatidão = $[(C_{obs} - C_{adicionada}) / C_{adicionada}] \times 100$

- **Estabilidade**

A estabilidade é o parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo (BRASIL, 2012).

Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante o manuseio da amostra, após armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise (BRASIL, 2012).

- Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi determinada em duas concentrações, CQB (0,175µg/mL em plasma) e CQA (7,5µg/mL em plasma), em triplicata. As amostras foram mantidas a temperatura ambiente (22°C) por 4 horas. Após este período, as amostras foram processadas e analisadas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos de amostras recém-preparadas (RP) e analisadas imediatamente.

As amostras mostraram-se estáveis em ambas as concentrações, baixa e alta, com desvios de 0,25% e 8,69%, respectivamente, sendo que variação de até 15% seria permitida.

- Estabilidade pós-processamento

As amostras avaliadas no teste de estabilidade pós-processamento foram preparadas e extraídas, ficando acondicionadas em temperatura ambiente (22°C) por 24 horas. As amostras mostraram-se estáveis, com desvios abaixo de 15%, em ambas as concentrações, baixa e alta, com desvios de 13,70% e 12,04%, respectivamente, sendo que variação de até 15% era permitida.

- Estabilidade após ciclos de congelamento

As amostras de plasma foram adicionadas de padrão de PG e de metformina e foram congeladas a -70°C. Passaram por 3 ciclos de congelamento e descongelamento, sendo então processadas e analisadas. As amostras mostraram-se estáveis em ambas as concentrações, baixa e alta, com desvios de 10,99% e 11,24%, respectivamente, sendo que seria permitida a variação de até 15%.

- Estabilidade de longa duração

As amostras de plasma foram adicionadas de padrão de PG e de metformina e foram congeladas a -70°C. Permaneceram congeladas por um período de 1,5 ano, que compreendeu o período entre a coleta da primeira amostra e a análise da última amostra. Após esse período, foram processadas e analisadas. As amostras mostraram-se estáveis em ambas as concentrações, baixa e alta, com desvios de 8,50% e 13,01%, respectivamente, sendo que seria permitida a variação de 15%.

ANEXO A – APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1053

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada " Desenvolvimento e avaliação de sistemas nanoencapsulados e mecanismos envolvidos na interação pregabalina-amitriptilina no tratamento de dor neuropática em animais", registrada com o nº 57/2016, sob a responsabilidade de Vanessa Bergamin Boralli Marques, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS em 30/01/2017.

Finalidade	() Ensino	(X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 31/01/2017 a 30/07/2020	
Espécie/linhagem/raça	Rato Wistar / heterogênico	
Nº de animais	478	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central da UNIFAL	

Alfenas, 31 de Janeiro de 2017.

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
 Coordenador - CEUA-UNIFAL